

Zelluläres Sepsismodell:
Untersuchung septischer Veränderungen
am *in vitro*-Modell embryonaler Stammzellen der Maus
im Vergleich zu septischen Veränderungen *in vivo*

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Angefertigt am Universitätsklinikum Jena – Klinik für Innere Medizin I
Universitäts-Herzzentrum Thüringen
AG Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung

von Saskia Nitza
geboren am 25.07.1983 in Berlin

Gutachter

1. Prof. Dr. Maria Wartenberg, Jena
2. Prof. Dr. Ferdinand von Eggeling, Jena
3. Prof. Dr. Gabriele Pfitzer, Köln

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.04.2016

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
AG	Antigen
AK	Antikörper
CBA	<i>Cytometric beat Array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGD	<i>Chronic granulomatous disease</i>
cTnI	kardiales Troponin I
DAB	3',3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EB	<i>Embryoid Body</i>
ELISA	<i>Enzym-linked immunosorbent Assay</i>
ESBL	<i>Extended-Spectrum-Betalactamase</i>
ES	Embryonale Stammzelle
FACS	<i>Fluorescence-aktivated cell sorting</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LPB	<i>Lipopolysaccharide-binding-protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LPA	<i>Lipoteichoic acid</i>
LSM	<i>Laser scanning microscope</i>
OT	Objektträger
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCI	<i>Peritoneal Contamination and Infection</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCT	Procalcitonin
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PBS-T	PBS-Triton X-100
P3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RTase	Reverse Transkriptase
RTD-PCR	<i>Real time- Polymerase Chain Reaktion</i>
SEM	<i>Standard error oft the mean</i>
SF	<i>Spinnerflasche</i>
SLAM	<i>self ligand and cell surface receptor</i>
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF- α	Tumor nekrose Faktor α

-Abkürzungsverzeichnis-

TSST	Toxic Shock Syndrom Toxin
ICM	Innere Zellmasse
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
MAF	<i>macrophage-activating factor</i>
MODS	<i>Multi-organ-dysfunktion-syndrom</i>
MCH-II	<i>major histocompatibility complex II</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MW	Mittelwert
NADPH	<i>Nicotinamidadenindinukleotidphosphat</i>
NOX	<i>Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidasen</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	- 2 -
2	Einleitung	- 4 -
2.1	<i>Sepsis</i>	<i>- 4 -</i>
2.2	<i>Sepsis und myokardiale Dysfunktion</i>	<i>- 5 -</i>
2.3	<i>Makrophagen: Aktivierung</i>	<i>- 5 -</i>
2.4	<i>Zytokine.....</i>	<i>- 7 -</i>
2.4.1	<i>Proinflammatorische Zytokine.....</i>	<i>- 7 -</i>
2.4.2	<i>Anti-inflammatorische Zytokine.....</i>	<i>- 8 -</i>
2.5	<i>Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)</i>	<i>- 8 -</i>
2.5.1	<i>Respiratory burst</i>	<i>- 9 -</i>
2.5.2	<i>NOX.....</i>	<i>- 9 -</i>
2.5.2.1	<i>NOX2.....</i>	<i>- 9 -</i>
2.6	<i>Sepsismarker.....</i>	<i>- 11 -</i>
2.7	<i>Stammzellen</i>	<i>- 11 -</i>
2.7.1	<i>Embryonale Stammzellen (ES).....</i>	<i>- 12 -</i>
2.7.2	<i>Embryoid Body (EB)</i>	<i>- 12 -</i>
3	Zielstellung.....	- 14 -
4	Material und Methoden	- 15 -
4.1	<i>Materialien.....</i>	<i>- 15 -</i>
4.1.1	<i>Geräte.....</i>	<i>- 15 -</i>
4.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>- 16 -</i>
4.1.3	<i>Chemikalien und Reagenzien.....</i>	<i>- 16 -</i>
4.1.4	<i>Puffer und Lösungen.....</i>	<i>- 17 -</i>
4.1.5	<i>Zellkultur.....</i>	<i>- 18 -</i>
4.1.5.1	<i>Zelllinien.....</i>	<i>- 18 -</i>
4.1.5.2	<i>Medien, Medienzusätze und – zusammensetzungen.....</i>	<i>- 18 -</i>
4.1.6	<i>Kultivierung der Bakterien.....</i>	<i>- 18 -</i>
4.1.7	<i>Anzucht der Bakterien</i>	<i>- 18 -</i>
4.1.8	<i>Infektion der Stammzellen mit GFP+ E.coli.....</i>	<i>- 19 -</i>
4.1.9	<i>Histologie.....</i>	<i>- 19 -</i>
4.1.10	<i>Immunologische Messverfahren</i>	<i>- 19 -</i>
4.1.10.1	<i>Immunfluoreszenzfärbung</i>	<i>- 19 -</i>
4.1.11	<i>Durchflusszytometrie</i>	<i>- 19 -</i>
4.1.12	<i>Nukleinsäureanalytik</i>	<i>- 20 -</i>
4.1.13	<i>Proteinanalytik</i>	<i>- 20 -</i>
4.1.14	<i>Inhibitoren.....</i>	<i>- 21 -</i>
4.1.15	<i>Kits.....</i>	<i>- 21 -</i>
4.1.16	<i>Software.....</i>	<i>- 21 -</i>
4.2	<i>Methoden</i>	<i>- 22 -</i>
4.2.1	<i>Zellkultur: CGR8-Zelllinie.....</i>	<i>- 22 -</i>
4.2.1.1	<i>Kultivierung undifferenzierter muriner embryonaler Stammzellen</i>	<i>- 22 -</i>
4.2.1.2	<i>Kultivierung von EBs (Embryoid bodies) in der Spinnerflasche (SF).....</i>	<i>- 22 -</i>
4.2.1.3	<i>Ausplattieren der EBs</i>	<i>- 23 -</i>
4.2.2	<i>Gewinnung der In vivo- Proben von Mäusen.....</i>	<i>- 23 -</i>
4.2.2.1	<i>Serum</i>	<i>- 24 -</i>
4.2.2.2	<i>Herzgewebe.....</i>	<i>- 24 -</i>
4.2.3	<i>Green/Red fluorescenc protein (GFP/RFP)-Bakterien.....</i>	<i>- 24 -</i>
4.2.3.1	<i>Elektroporation und Integration des GFP/RFP-tragenden Plasmids</i>	<i>- 24 -</i>
4.2.3.2	<i>Anzucht und Selektion der GFP/RFP-tragenden Bakterien</i>	<i>- 25 -</i>
4.2.3.3	<i>Infektion der murinen differenzierten Stammzellen.....</i>	<i>- 25 -</i>

-Inhaltsverzeichnis-

4.2.4	Semiquantitativer Nachweis von Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	- 25 -
4.2.4.1	Fluorimetrisches Assay an EBs nach Exposition mit Sepsis-Serum.....	- 25 -
4.2.5	Histologie.....	- 25 -
4.2.5.1	Gewebeproben für Kryoschnitte	- 25 -
4.2.5.2	Aufarbeitung der Gewebeproben für Paraffineinbettung	- 25 -
4.2.5.3	Färben der Gewebeproben	- 26 -
4.2.6	Immunologische Messverfahren	- 27 -
4.2.6.1	Immunofluoreszenz.....	- 27 -
4.2.6.2	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	- 28 -
4.2.7	Durchflusszytometrische Messverfahren	- 29 -
4.2.7.1	Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS).....	- 29 -
4.2.7.2	FACS mit Hilfe von Fluorochromen.....	- 29 -
4.2.7.3	FACS nach GFP-Signal	- 30 -
4.2.7.4	Cytometric bead Array (CBA)	- 30 -
4.2.8	Nukleinsäureanalytik	- 31 -
4.2.8.1	RNA-Extraktion	- 31 -
4.2.8.2	Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung	- 31 -
4.2.8.3	cDNA-Synthese	- 32 -
4.2.8.4	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	- 32 -
4.2.8.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	- 34 -
4.2.8.6	<i>Real-time-PCR</i> [RTD-PCR].....	- 34 -
4.2.8.7	Primer und Housekeeping.....	- 35 -
4.2.9	Proteinanalytik	- 36 -
4.2.9.1	Proteinisolation und Proteinkonzentrationsbestimmung.....	- 36 -
4.2.9.2	Diskontinuierliche SDS-Page.....	- 37 -
4.2.9.3	Westernblot-Tankblotting	- 38 -
4.2.9.4	Immundetektion und Strippen der Membran	- 38 -
4.2.10	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (cLSM).....	- 39 -
4.2.11	Statistik	- 39 -
5	Ergebnisse	- 40 -
5.1	<i>Spontane Differenzierung der murinen EBs in potentiell immunkompetente Zellen.....</i>	<i>- 40 -</i>
5.2	<i>Phagozytosefähigkeit der Makrophagen.....</i>	<i>- 41 -</i>
5.3	<i>Zellsorting nach Phagozytose von GFP- oder RFP-markierten E. coli.....</i>	<i>- 42 -</i>
5.4	<i>Hemmung der Phagozytose durch Cytochalasin.....</i>	<i>- 43 -</i>
5.5	<i>Phagozytose von multiresistenten Keimen innerhalb des Modells.....</i>	<i>- 45 -</i>
5.6	<i>ROS bei der septischen myokardialen Dysfunktion</i>	<i>- 46 -</i>
5.6.1	Vitalitätsmessung der zu Kardiomyozyten differenzierten Stammzellen unter inflammatorischen Bedingungen.....	- 46 -
5.6.2	Bildung von ROS durch EBs	- 47 -
5.7	<i>Bildung von ROS am Herzgewebe der Maus</i>	<i>- 49 -</i>
5.7.1	Residente myokardiale Makrophagen als mögliche ROS-Produzenten.....	- 50 -
5.8	<i>NOX2 als Hauptquelle der ROS-Produktion</i>	<i>- 52 -</i>
5.8.1	NOX2 am Herzgewebe der Maus	- 52 -
5.8.2	NOX2 Produktion der EBs.....	- 53 -
5.9	<i>Untersuchungen der Reaktionsfähigkeit der EBs nach inflammatorischem Reiz.....</i>	<i>- 53 -</i>
5.9.1	Frequenzzählung	- 54 -
5.9.2	Bestimmung des kardialen Troponins I (cTnI)	- 54 -
5.9.3	Bestimmung des Sepsismarkers Procalcitonin (PCT).....	- 56 -
5.9.4	Inflammation.....	- 58 -
5.9.4.1	Interferon- γ (INF- γ)	- 58 -
5.9.4.2	Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α).....	- 58 -
5.9.4.3	Interleukin-6 (IL-6).....	- 59 -
5.9.4.4	Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)	- 60 -
5.9.4.5	Interleukin-10 (IL-10).....	- 60 -
5.9.4.6	Interleukin-12 p70 (IL-12p70)	- 61 -

6	Diskussion	- 62 -
6.1	<i>Antibakterielle Kapazität und Aktivierung von EBs.....</i>	<i>- 62 -</i>
6.2	<i>Identifizierung und Isolierung von phagozytotisch aktiven Zellen.....</i>	<i>- 63 -</i>
6.3	<i>Steuerbarkeit der ES hinsichtlich ihrer phagozytotischen Aktivität.....</i>	<i>- 64 -</i>
6.4	<i>Immunologische Reaktion der phagozytotisch aktiven Zellen.....</i>	<i>- 64 -</i>
6.5	<i>Pathophysiologische Aspekte der septischen Kardiomyopathie an ES.....</i>	<i>- 65 -</i>
6.6	<i>Rolle der ROS bei der septischen kardialen Dysfunktion</i>	<i>- 66 -</i>
6.7	<i>Genexpression von CD11b, F4/80 und CD 68 am Herzgewebe der Maus</i>	<i>- 67 -</i>
6.8	<i>Transfer von immunkompetenten Zellen als Sepsistherapie mit Hilfe von ES</i>	<i>- 68 -</i>
7	Schlussfolgerung.....	- 70 -
8	Literaturverzeichnis.....	- 72 -
9	Anhang	- 87 -
9.1	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	<i>- 87 -</i>
9.2	<i>Danksagung</i>	<i>- 88 -</i>
9.3	<i>Lebenslauf.....</i>	<i>- 89 -</i>
9.4	<i>Publikation.....</i>	<i>- 90 -</i>

1 Zusammenfassung

Sepsis durch nosokomiale Infektionen hat einen hohen Stellenwert im Klinikalltag. Sie ist in allen Bereichen der Klinik, hauptsächlich in der intensivmedizinischen Betreuung, Onkologie und der Chirurgie, von Relevanz. Die grundlegenden zellulären und molekularen Mechanismen der Sepsis sind weitgehend bekannt, trotzdem sind Prävention, Früherkennung und Therapieoptionen weiterhin Bestandteil von Forschungsreihen. In der vorliegenden Arbeit werden molekulare und zelluläre Veränderungen anhand eines *in vitro*- Modells des *Embryoid Body* (EB) der murinen *embryonalen Stammzell*-(ES)-Linie CGR8 im Kontext der Sepsis untersucht und zum *in vivo*- Vergleich mit aus Mäusen mit Sepsisinduktion gewonnenem Gewebe und Serum verglichen. Um die EBs und die Mäuse unter septischen Bedingungen auf ihre Reaktionsfähigkeit zu testen, wurde ein starker inflammatorischer Reiz durch *Escherichia coli* [E. coli] gesetzt. Dieser wurde bei den EBs mit der *multiplicity of infection* (MOI) und bei den Mäusen durch die *peritoneal contamination and infection* (PCI) verwirklicht. Die EBs differenzieren spontan in potentiell immunkompetente Zellen. Um diese Zellen zu charakterisieren wurden spezielle Oberflächenantigene wie CD45, CD68, CD11b und F4/80 mithilfe Immunofluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Durch mit *green fluoreszenz protein* (GFP)-/ *red fluoreszenz protein* (RFP)- markierten E. coli als „Köder“ für die *in vitro*- Makrophagen konnte gezeigt werden, dass sie zur Phagozytose fähig sind. Des Weiteren ließ sich die Phagozytose durch das Spindelzellgift Cytochalasin D unterbinden und auch klinisch relevante Keime mit *extended spectrum* Betalactamasen (ESBL)-Resistenz wurden im Modell phagozytiert. *Reaktive Sauerstoffspezies* (ROS) werden von Leukozyten als Antwort auf inflammatorische Reize generiert. Die Reaktionsfähigkeit der EBs hinsichtlich der ROS-Produktion auf einen inflammatorischen Reiz wurde *in vitro* durch Seren von Mäusen mit Sepsisinduktion provoziert und durch den fluoreszierenden Farbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) dargestellt. *In vivo* am Herzgewebe von Mäusen mit Sepsisinduktion gelang die Darstellung der Zunahme der ROS-Generierung durch die enzymatisch-histochemische Färbung mit 3',3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB). Als ROS-Quelle wurde die makrophagenspezifische Nicotinamadenindinukleotidphosphat-Oxidase 2 (NOX2) auf ihre genetische Expression untersucht. Die Hochregulierung der NOX2 wurde am Herzgewebe von Mäusen mit Sepsisinduktion durch *polymerase chain reaction* (PCR) und am EB mit dem Westernblot gezeigt. Ebenfalls konnte im Herzgewebe von Mäusen mit Sepsisinduktion durch *real*

time- (RTD)-PCR eine erhöhte Expression des Makrophagen-spezifischen Oberflächenantigens CD11b nachgewiesen werden. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen zur Reaktionsfähigkeit des EB auf einen inflammatorischen Stimulus. Es wurde die Vitalität und die Frequenz der schlagenden Areale über die Zeit beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die EBs auf den inflammatorischen Reiz mit einer Schlagfrequenzerhöhung reagieren und im weiteren Verlauf an Vitalität und damit verbunden auch an Schlagfrequenz abnahmen. Es konnte weiterhin sowohl *in vitro* an den EBs als auch *in vivo* in den Seren der Mäuse mit Sepsisinduktion ein signifikanter Anstieg des *cardialen Troponin I* (cTnI) und des Sepsismarkers *Procalcitonin* (PCT) auf Werte > 2,0 ng/ml nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten erhöhte Zytokinkonzentrationen in den Überständen der EBs und in den Seren der Mäuse mit Sepsisinduktion nachgewiesen werden. Sowohl proinflammatorische Zytokine wie das *Interleukin 6* (IL-6), der *Tumor nekrose Faktor α* (TNF- α) und das *Monocyte-Chemotactic protein-1* (MCP-1) als auch anti-inflammatorische Zytokine wie das *Interleukin 10* (IL-10) und das *Interleukin 12* (IL-12) zeigten Signifikanzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die EBs als potentiell *in vitro* Sepsismodell geeignet sind, da der multifaktorielle molekulare und zelluläre Ablauf der Infektion durch gramnegative Bakterien nachvollzogen werden konnte. Die EBs könnten also in zukünftigen Studien der Sepsis alternativ als Tierversuchersatzmodell genutzt werden.

2 Einleitung

Das Krankheitsbild der Sepsis wurde erstmals 1992 vom *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* beschrieben und ist eine Form einer dysregulierten Inflammation (Bone 1992) bei der Reaktion auf eine schwere Infektion. Bei der Sepsis handelt es sich um ein klinisches Syndrom mit einer gesicherten oder wahrscheinlichen bakteriämischen Infektion mit klinischer Manifestation (Levy et al. 2003). Diagnostische Kriterien der Sepsis sind u.a Körpertemperaturen $> 38,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$, Tachykardie > 90 Schläge/min, Leukozytose oder Leukopenie, Thrombozytopenie, Hypotonie MAP $< 70\text{ mmHg}$ und Endothelschädigung (Dellinger et al. 2008). Durch die Hypotonie und die Endothelschädigung kommt es zur Organdysfunktion und intravasalen Flüssigkeitsverlusten, die in den septischen Schock und das *Multiorgandysfunktions-syndrom* (MODS) und letztlich zum Tode des Patienten führen. Hohe Relevanz zeigt die Sepsis in der intensivmedizinischen Versorgung von Patienten. Auf Intensivstationen in Deutschland liegt die Inzidenz bei 110/100.000 Einwohner pro Jahr und die 90-Tage-Sterblichkeit bei 54 % (Hagel and Brunkhorst 2011). Die hohen Sterberaten sind Ausdruck der Relevanz von Forschung an diesem Thema, um die molekularbiologischen Abläufe besser zu verstehen und die Therapie zu optimieren.

2.1 Sepsis

Das Wort „Sepsis“ kommt aus dem Griechischen und bedeutet „Zerfall“ bzw. „Zersetzung“. Bei der Sepsis steht die Bakteriämie an vorderster Stelle (Sagy et al. 2013). Der häufigste Erreger ist das gramnegative Bakterium *E. coli*. Gramnegative Bakterien tragen in ihrer Membran *Lipopolysaccharide* (LPS). Beim Zerfall von *E. coli* werden die LPS freigesetzt, wirken als Toxine und führen zur Aktivierung immunkompetenter Zellen. Die Endotoxine führen ihrerseits zur Aktivierung von Makrophagen. Aktivierte Makrophagen setzen pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Mediatoren frei (Sagy et al. 2013). Bei der Produktion und Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren durch Zellen der humoralen Abwehr unterscheidet man frühe und späte Mediatoren. Das Problem der Sepsis ist ein Ungleichgewicht zwischen Aktivierung und Inhibition des Immunsystems, dies führt zum septischen Schock mit MODS (Brunkhorst 2006). Eine weitere Rolle während der überschießenden Inflammation spielen die ROS, hier vor allem NOX2, die von aktivierten Leukozyten generiert werden. Die Aufgabe der

ROS liegt in der Abwehr von Bakterien oder in der Eliminierung von Bakterien durch Phagozytose (Root and Metcalf 1977).

2.2 Sepsis und myokardiale Dysfunktion

Sepsis ist wie bereits beschrieben eine Entzündungsreaktion auf eine schwere Infektion. Die schwere der Erkrankung hängt einerseits von der Art und Menge des Pathogens und andererseits von der Leistungsfähigkeit des spezifischen und unspezifischen Immunsystems des Patienten ab (Bone et al. 1997). Die myokardiale Dysfunktion ist eine häufige Komplikation bei Sepsispatienten (Paoli et al. 2006). Sie geht mit Sterberaten von ca. 70 % im Gegensatz zu Patienten ohne kardiovaskuläre Beteiligung einher (Parrillo et al. 1990, Blanco et al. 2008). Deshalb ist die frühe Erkennung und Einleitung einer aggressiven supportiven Therapie obligat. Die myokardiale Dysfunktion ist der häufigste Grund für den Tod von Sepsispatienten. Das initiale Problem der septischen myokardialen Dysfunktion ist ein hyperdynamischer Zustand mit Endothelschädigung durch eine erhöhte Permeabilität des Endothels und einem erhöhten Herzindex nach adäquater Volumentherapie. Echokardiographische Charakteristika der septischen myokardialen Dysfunktion sind die Dilatation beider Ventrikel, eine erniedrigte Kontraktilität und eine diastolische Dysfunktion (Paoli et al. 2006). Studien zeigen, dass eine erniedrigte linksventrikuläre Ejektionsfraktion mit einem schlechteren Outcome einhergeht (Charpentier et al. 2004). Es kann allerdings auch vorkommen, dass die Herzinsuffizienz bei der Sepsis durch eine normale Auswurfleistung des Herzens maskiert wird. Die pathophysiologischen Vorgänge bei der myokardialen Dysfunktion wurden erstmals 1970 beschrieben (Lefer 1970). Heute zeigen Studien, dass die septische myokardiale Dysfunktion nicht nur durch die Hypoperfusion bedingt sondern auch Folge der durch den Entzündungsprozess zirkulierenden Mediatoren ist. Bei diesen Mediatoren handelt es sich um Zytokine, die ihrerseits dazu führen, dass wichtige Mechanismen bei der Abwehr von Pathogenen wie die ROS herabreguliert werden (Flierl et al. 2008). Ein Marker für den Untergang von Kardiomyozyten stellt das cTnI dar. Das cTnI ist Teil des kontraktilen Apparates der quergestreiften Muskulatur des Herzens und ist ein Maß für die kardiale Schädigung (John et al. 2010, Landesberg et al. 2014).

2.3 Makrophagen: Aktivierung

Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten und kommen entweder als mobile Zellen im peripheren Blut oder als residente Zellen in Geweben vor. Man nennt sie dann auch Gewebsmakrophagen. Ihre Aufgabe besteht darin, Pathogene durch Aufnahme und Verdau

unschädlich zu machen. Durch Infektionen werden chemotaktische Reize freigesetzt, die es den mobilen Zellen ermöglichen, ins Gewebe einzuwandern und dort zu verbleiben. Diese chemotaktischen Reize werden durch Chemokine vermittelt. MCP-1 ist eines der Schlüsselchemokine bei der selektiven Rekrutierung von Makrophagen. Es reguliert ihre Migration und Infiltration ins Gewebe (Deshmane et al. 2009). Die Aktivierung der Makrophagen erfolgt je nach Toxin unterschiedlich. Bei gramnegativen Bakterien wie z.B. *E. coli* handelt es sich bei dem Toxin um ein Endotoxin. Das Endotoxin besteht aus einem Baustein der Zellmembran, dem LPS (Rietschel et al. 1994). Während der Ausbildung des angeborenen Immunsystems zur Abwehr von Pathogenen ist einer der ersten Schritte die Erkennung von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). Das am Besten untersuchte PAMP ist das LPS. Das LPS wird an das *Lipopolysaccharide-binding protein* (LPB) gebunden. Erst der LPS-LPB-Komplex aktiviert die Makrophage über den toll-like receptor 4 (TLR4) und das Oberflächenmoleküle CD14 (Arditi et al. 1993, Schumann et al. 1994). Der TLR gehört zu den *pattern recognition receptors* (PRRs). Die durch TLR4 und CD14 aktivierte Makrophage sezerniert pro- und anti-inflammatorische Zytokine. In Versuchen an Mäusen mit CD14- Knockout konnte eine Resistenz gegen Endotoxin von gramnegativen Bakterien gezeigt werden (Haziot et al. 1996). Nach Kontakt mit Exotoxin grampositiver Bakterien präsentieren Makrophagen über den *major histocompatibility complex II* (MHC II) Proteinfragmente des Pathogens, die von T-Lymphozyten erkannt werden. Der T-Lymphozyt sezerniert daraufhin INF- γ (Bancroft et al. 1994, Celada and Nathan 1994). Es ist ein Glykoprotein, das eine aktivierende Wirkung auf Makrophagen hat und deshalb auch als *macrophage-activating factor* (MAF) bezeichnet wird (Nathan, Murray et al. 1983, Nathan, Prendergast et al. 1984). Es bewirkt eine bessere Verschmelzung von Phagosom mit Lysosom und fördert die ROS- Produktion (Nathan et al. 1983). Die ROS sind eine der grundlegendsten Mechanismen bei der Abwehr von Pathogenen (2.5). Desweiteren triggert INF- γ bei Infektionen mit grampositiven Bakterien die Freisetzung von Zytokinen durch Makrophagen. In dieser Arbeit wird der Aktivierungsweg über gramnegative Bakterien durch *E. coli* genutzt.

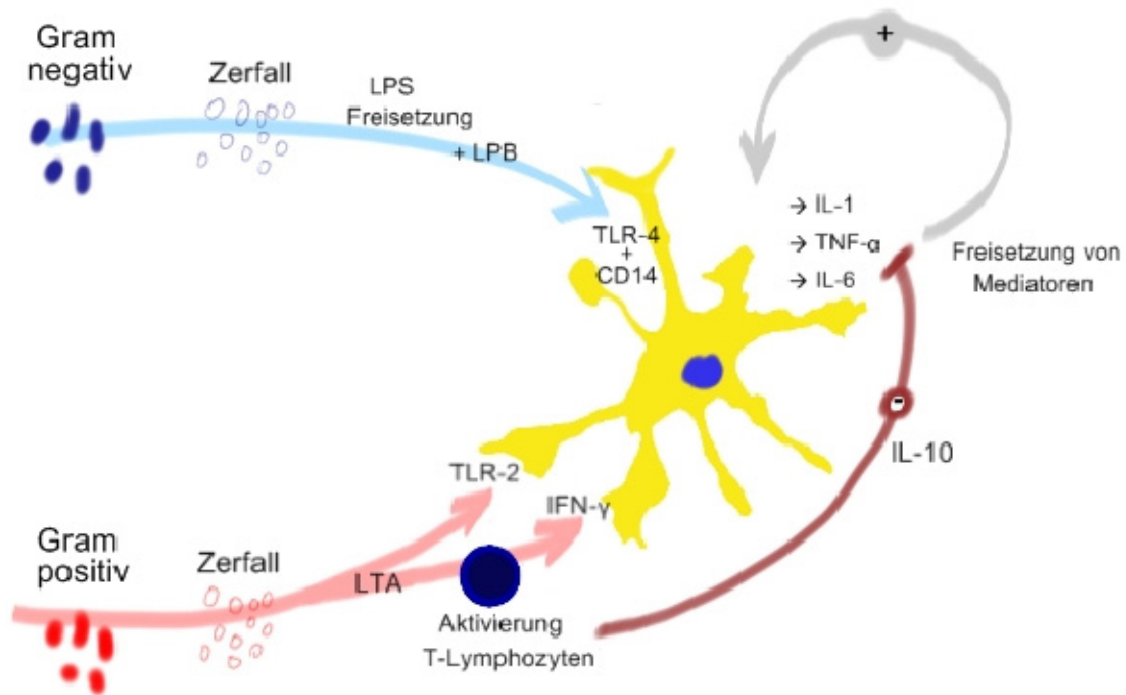


Abb. 1: Aktivierung von Makrophagen durch Bakterien bei septischen Infektionen und Freisetzung von Mediatoren, modifiziert nach (Sagy et al. 2013)

2.4 Zytokine

Zu den Zytokinen gehören *Interferone* (IFN), *Interleukine* (IL), Kolonie-stimulierende Faktoren, *Tumornekrosefaktoren* (TNF) und Chemokine. Sie regulieren das Wachstum, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen. Außerdem triggern sie immunologische Reaktionen und Entzündungsprozesse. Bei der Sepsis wird eine Kaskade von pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Mediatoren freigesetzt, die dann ihrerseits zu den oben genannten klinischen Zeichen einer Sepsis führen (Morrison and Ryan 1987).

2.4.1 Proinflammatorische Zytokine

Zu den frühen proinflammatorischen Zytokinen bei einer Sepsis gehören u.a. TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-12 (Lauw et al. 1999). Die Zytokinkaskade wird durch einen Stimulus (2.3) in Gang gesetzt. TNF- α wird von aktivierten Makrophagen sezerniert und hat eine Reihe von Effekten, z.B. Fieber, hämodynamische Dysfunktion, Leukopenie und Koagulopathie (Chapman et al. 1987, Selby et al. 1987). Außerdem triggert TNF- α andere Zytokine wie IL-1 und IL-6 und koordiniert ihr Zusammenspiel (Blackwell and Christman 1996).

IL-1 hat eine ähnliche Wirkung wie TNF- α und kann TNF- α induzieren. (Dinarello 1991, van der Poll et al. 1995). Sowohl TNF- α als auch IL-1 sind Gegenstand von Forschungsreihen. Veröffentlichungen zeigen, dass ihre Inhibition zu einer Abschwächung

der Sepsis führt (Fischer et al. 1992, Dinarello et al. 1993). Zu den späten proinflammatorischen Zytokinen gehört u.a. IL-6 (Shalaby et al. 1989). IL-6 wird von vielen Zellen gebildet, beispielsweise von Makrophagen/Monozyten, Fibroblasten und Lymphozyten und hat viele Effekte, u.a. die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten, die Aktivierung der Gerinnung (Blackwell and Christman 1996) und die Suppression der Aktivität von TNF- α und IL-1 (Aderka et al. 1989, Schindler et al. 1990). Allen genannten proinflammatorischen Zytokinen ist gemein, dass sie die Produktion von Akute-Phase Proteinen in der Leber induzieren (Gauldie et al. 1987). Es wurde festgestellt, dass die Höhe von TNF- α und IL-1 mit der Schwere und der Prognose von an Sepsis Erkrankten korreliert (Munoz et al. 1991).

2.4.2 Anti-inflammatorische Zytokine

Die anti-inflammatorischen Zytokine werden im Rahmen der Infektkaskade später gebildet als die proinflammatorischen und sorgen für das Gleichgewicht zwischen Pro- und Antiinflammation. Zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gehört u.a. IL-10. Es wird von TH-2-Zellen gebildet und inhibiert u.a. TNF- α , IL-1 und IL-6 (Gerard et al. 1993). Insbesondere diese Zytokine sind dadurch Ansatz bei der Forschung nach geeigneten Therapiemöglichkeiten der Sepsis.

2.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

ROS werden physiologischerweise in der Atmungskette der Mitochondrien produziert (Boveris and Chance 1973) und sind sogenannte „Sauerstoffradikale“. Zu ROS zählen freie Radikale wie das Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$, das Hydroxyradikal OH^{\cdot} , das Peroxylradikal ROO^{\cdot} und das Alkoxyradikal RO^{\cdot} . Außerdem gibt es stabile molekulare Formen wie das Wasserstoffperoxid H_2O_2 und das Hydroperoxid $ROOH$. Lange Zeit galten ROS ausschließlich als schädigende intermediäre Metabolite (Okabe et al. 1985, Kukreja et al. 1986, Heinzl et al. 1992). Sie wurden dem oxidativem Stress und Alterungsprozessen zugeschrieben (Harman 1956). Es konnte gezeigt werden, dass ROS eine modifizierende Wirkung in Desoxyribosomen haben, die zu Strangbrüchen und Fehlpaarungen führt (Sies and Mehlhorn 1986). Des Weiteren sind ROS für Lipidoxidationen verantwortlich, die zu Funktionsverlusten führen (Lai and Piette 1977, Davies 1987). ROS haben aber auch regulatorische Aufgaben in der synaptischen Plastizität des Gehirns und der Gedächtnisbildung (Tejada-Simon et al. 2005, Serrano et al. 2003), bei der Einleitung des programmierten Zelltods (Schreck et al. 1991, Abello et al. 1994) und als unterstützender Metabolit bei Wachstumsprozessen und bei der kardialen Differenzierung (Buggisch et al.

2007). Eine weitere wichtige Funktion der ROS besteht in der bakteriellen Abwehr. Hierbei nutzen die Granulozyten die Wirkung des Superoxidanions und produzieren mit Hilfe von NADPH-Oxidasen (NOX) im sogenannten *respiratory burst* ROS (Root and Metcalf 1977).

2.5.1 Respiratory burst

Unter *respiratory burst* oder oxidativem Burst versteht man die schnelle Generierung von ROS auf einen Stimulus durch Granulozyten. Der *respiratory Burst* wurde 1933 erstmals an Phagozyten gezeigt (Mudd and Mudd 1933), ist Teil des humoralen Immunsystems und dient der Abwehr von Bakterien durch Phagozytose. NADPH-Oxidasen sind membranständige Enzyme, die in Leukozyten vorkommen. Sie bilden freie Radikale, indem freie Elektronen über die Membranen ins Zellinnere geschleust werden. Dort entsteht mit Sauerstoff (O_2) dann Superoxid (Babior et al. 1973). Durch Phagozytose nimmt der Sauerstoffverbrauch von Granulozyten zu und damit auch die Bildung von ROS (Baldrige CW 1933). Aus O_2 und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat [NADPH] (Rossi and Zatti 1964) werden Superoxidanionen [O_2^-] katalysiert. O_2^- ist dabei Ausgangspunkt weiter ROS wie z.B. auch H_2O_2 . H_2O_2 ist membrangängig und wird intrazellulär bei Zerfall zu dem hochaktivem Hydroxylradikal OH^\cdot . Durch den *respiratory Burst* kann die intrazelluläre Phagozytose von Krankheitserregern realisiert werden.

2.5.2 NOX

Alle NOX sind Transmembranproteine, die Elektronen über die Zellmembran schleusen. Im Zellinneren dienen die Elektronen der Generierung von ROS. Der Elektronenakzeptor ist O_2 und das Produkt des Elektronentransfers sind Superoxide.

2.5.2.1 NOX2

NOX2, auch bekannt als Cytochrom b-245 heavy chain ist der Prototyp der NADPH-Oxidasen. NOX2 wurde als erstes in Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen beschrieben, weshalb man diese für Phagozyten spezifisch hielt. Heute weiß man, dass sie auch in anderen Zellen vorkommt, wie z.B. in Neuronen (Serrano et al. 2003), im Herzen (Heymes et al. 2003) bei Schädigung der Kardiomyozyten (Heymes et al. 2003) und bei Aktivitätssteigerung von Aldosteron und Angiotensin II (Oudot et al. 2003). NOX2 besteht aus 6 Transmembrandomänen und verbindet den Elektronendonator NADPH der zytosolischen Seite mit O_2 , dem Elektronenakzeptor, an der Membranaussenseite (Bedard and Krause 2007). Nach phagozytotischem Stimulus kommt es zur Translokation von NOX2 (Borregaard et al. 1983) und zur Fusion des Phagosoms mit der Plasmamembran

(Garcia and Segal 1984). Die mRNA- Expression von NOX2 wird durch $\text{INF-}\gamma$ getriggert, einem proinflammatorischen Zytokin, das von Makrophagen bei Antigen-Kontakt sezerniert wird (Newburger et al. 1988). NOX2 wurde sehr intensiv an Patienten mit *chronic granulomatous disease* (CGD) untersucht (Bedard and Krause 2007). Man ging davon aus, dass die körpereigene Abwehr von Pathogenen initial nur durch ROS-Generierung erfolgte. Es zeigte sich jedoch, dass für eine ROS-abhängige Abwehr von Bakterien ein Zusammenspiel von mehreren Mechanismen notwendig ist (Bedard and Krause 2007). Es wurde beschrieben, dass die Erkennung von PAMP und die Induktion der Bakterienabwehr über NOX2 von sogenannten *self ligand and cell surface receptor* (SLAM) getriggert werden (Berger et al. 2010). Die SLAM sorgen als Mediatoren für die Anreicherung von *Phosphatidylinositol-3-Phosphat* (P3P). P3P reguliert sowohl die NOX2 - Funktion, als auch die Fusion von Phagosom und Endosom (Berger et al. 2010). Studien an CGD- Patienten zeigten, dass NOX2 für die Abwehr von manchen Bakterien nicht erforderlich ist (Winkelstein et al. 2000). In den letzten Jahren zeigte sich in Versuchen an Mäusen, dass die NOX2- Funktion viel mehr von der korrekten Differenzierung von CD11b⁺- Zellen abhängt (Lee et al. 2011).

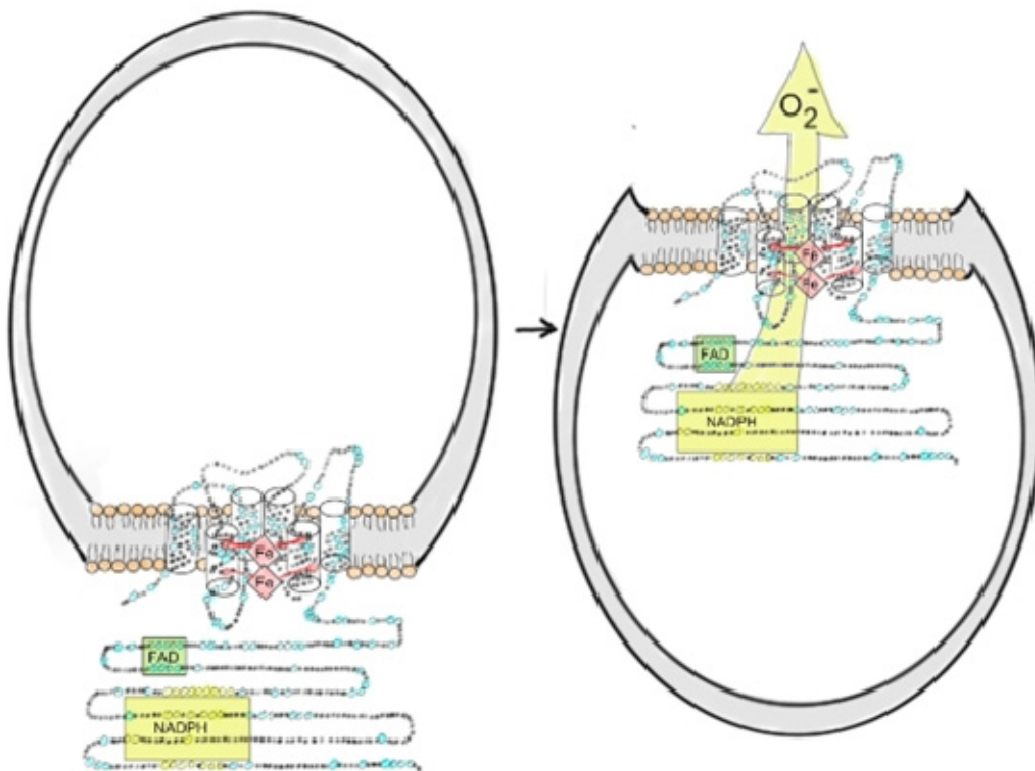


Abb. 2: Schematische Darstellung von NOX2 und der Generierung von ROS , modifiziert nach (Bedard and Krause 2007).

2.6 Sepsismarker

Procalcitonin (PCT) ist der prognostisch beste „Sepsismarker“ in der Frühphase von bakteriellen Infektionen, der derzeit bekannt ist (Russwurm et al. 1999). Bei akutem septischen Geschehen besitzt PCT eine Sensitivität von 77 % und eine Spezifität von 79 % (Schlattmann and Brunkhorst 2013). PCT ist das Prohormon von Calcitonin und wird unter physiologischen Bedingungen von den C-Zellen der Schilddrüse als Antwort auf eine Hypercalciämie gebildet (Simon et al. 2004). Bei akuten inflammatorischen Prozessen wird vermehrt PCT gebildet. Der Mechanismus der PCT-Erhöhung ist unklar, allerdings wird vermutet, dass der Hauptsyntheseort dann in der Leber liegt (Nijsten et al. 2000). Auch Zellen des peripheren Blutes sind in der Lage PCT zu bilden (Oberhoffer et al. 1999). Die Triggersubstanz für die vermehrte hepatische Sekretion ist LPS, Bestandteile der bakteriellen Zellmembran und Cytokine, die bei der Sepsis von Makrophagen sezerniert werden (Simon et al. 2004). PCT ist ein hilfreicher Biomarker; allerdings muss er vorsichtig interpretiert werden, da er auch aus anderen Gründen erhöht sein kann, wie z.B. durch ein C-Zell-Karzinom der Schilddrüse oder bei einem Polytrauma (Hensler et al. 2003). Das heißt, es müssen immer mikrobiologische Ergebnisse, das klinische Bild des Patienten und die Krankengeschichte mit berücksichtigt werden. Werte > 2ng/ml machen ein septisches Geschehen sehr wahrscheinlich (Hagel and Brunkhorst 2011).

2.7 Stammzellen

Pluripotente Stammzellen sind Zellen, die noch zur unbegrenzten Differenzierung und Entwicklung in der Lage sind. Es wird zwischen embryonalen und adulten Stammzellen unterschieden (Takahashi and Yamanaka 2006). Dabei können sich embryonale Stammzellen in jegliches Gewebe und die adulten Stammzellen nur noch in festgelegte Gewebetypen differenzieren. Adulte Stammzellen können durch retrovirale Transduktion von Transkriptionsfaktoren in ihren embryonalen Zustand re-programmiert werden. Diese re-programmierten Zellen werden als *induced pluripotent stem cells* (IPS-Zellen) bezeichnet und sind seit der Entdeckung dieses Prozesses Bestandteil Embryonen-unabhängiger Forschung (Tomioka et al. 2010 , Takahashi and Yamanaka 2006, Yamanaka and Takahashi 2006). Die IPS-Zellen haben ein hohes medizinisches Potenzial, sind allerdings noch nicht für die Stammzelltransplantation zugelassen, da es durch die Reprogrammierung zu Veränderungen im Genom der Empfängerzelle kommt und dadurch die Krebsentwicklung begünstigt werden kann.

2.7.1 Embryonale Stammzellen (ES)

Embryonale pluripotente undifferenzierte Stammzellen wurden erstmals 1981 gewonnen (Evans and Kaufman 1981). Die Gewinnung erfolgt aus der *Inneren Zellmasse* (ICM) einer circa dreieinhalb Tage alten Blastozyste einer Maus. Die in diesem Stadium pluripotente Blastozyste (Evans and Kaufman 1981) entsteht aus der totipotenten Zygote. Die Zygote ist im Gegensatz zur Blastozyste bzw. ES noch fähig, embryonales Gewebe und daraus einen Gesamtorganismus zu bilden. Die ES sind im Stande, sich in Zellen aller drei Keimblätter d. h. Ekto-, Endo- und Mesoderm zu differenzieren, und gelten damit als multipotent (Doetschman et al. 1985, Hubner et al. 2003). Die Nutzung von *knockout*-Mäusen wird realisiert, indem die aus der ICM gewonnenen Zellen einer anderen Maus injiziert werden. Die Zellen integrieren sich dann in die ICM der Empfängermaus. Die Blastozyste wird dann der „Spendermaus“ zurückinjiziert. Durch Über- und Reüberführung in die „Spendermaus“ entstehen Maus-Chimäre, die die Knockouts ermöglichten (Bradley et al. 1984). In vivo sorgen Transkriptionsfaktoren dafür, die ES pluripotent zu erhalten, da ES zu spontaner Differenzierung neigen (Nichols et al. 1998, Avilion et al. 2003, Chambers et al. 2003). In vitro wird die Undifferenzierbarkeit der ES durch den *leukemia inhibitory factor* (LIF) aufrechterhalten (Smith et al. 1988).

2.7.2 Embryoid Body (EB)

Die ES werden in Suspensionen kultiviert und bilden 3D-förmige, embryoähnliche Aggregate aus, die *embryoid bodies* (EB). Die Aggregation wird durch ein Spinnerflaschensystem realisiert (Wartenberg et al. 1998). Die EBs können sich in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren. Es konnten Zellen der endothelialen und hämatopoetischen Zelllinien sowie Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen, Skelettmuskelzellen, Knorpelzellen und Nervenzellen nachgewiesen werden (Wiles and Keller 1991, Keller et al. 1993, Rohwedel et al. 1994, Strubing et al. 1995, Vittet et al. 1996, Westfall et al. 1996, Drab et al. 1997, Kramer et al. 2000). Im Fokus dieser Arbeit stehen die verschiedenen Zelltypen des zellulären Immunsystems wie Monozyten/Makrophagen (Moore et al. 1998), Neutrophile Granulozyten (Keller et al. 1993), T-Lymphozyten (de Pooter et al. 2003), Natürliche Killerzellen (de Pooter et al. 2005) und Antigen-präsentierende dendritische Zellen die sich ebenfalls aus EBs differenzieren. Die Zellen des angeborenen Immunsystems, differenziert aus ES, tragen alle das hämatopoetische Oberflächenantigen CD34 (Kaufman et al. 2001). Es konnten ebenfalls physiologische Wege der Aktivierung des angeborenen Immunsystems den PAMPs an differenzierten EBs nachvollzogen werden (Foldes et al. 2010) und auch deren

Rezeptoren, den TLR, die die Abwehrmechanismen in Gang setzten (Foldes et al. 2010). Es ist also möglich, mit Hilfe von embryonalen Stammzellen Entzündungsprozesse nachzuahmen. Abgesehen von den Immunprozessen können im EB auch andere embryonale Entwicklungen, wie z.B. die des kardiovaskulären Systems, der endothelialen und angiogenetischen Entwicklung, beobachtet werden. Innerhalb der kardiovaskulären Entwicklung sind EBs in der Lage, spontan kontrahierende Kardiomyozyten zu bilden, die alle dafür nötigen physiologischen Gegebenheiten wie Ionenkanäle, Aktionspotentiale, kardiale Proteine und Rezeptoren aufweisen (Robbins et al. 1990, Wobus et al. 1991, Maltsev et al. 1994, Hescheler et al. 1999). Die EBs bieten weiterhin die Möglichkeit, Gene neu zu integrieren und auszuschalten. Dieses ermöglicht, physiologische Vorgänge auf Genomebene zu manipulieren (Fassler and Meyer 1995, Metzger et al. 1996, Wobus et al. 1997, Kolossov et al. 1998).

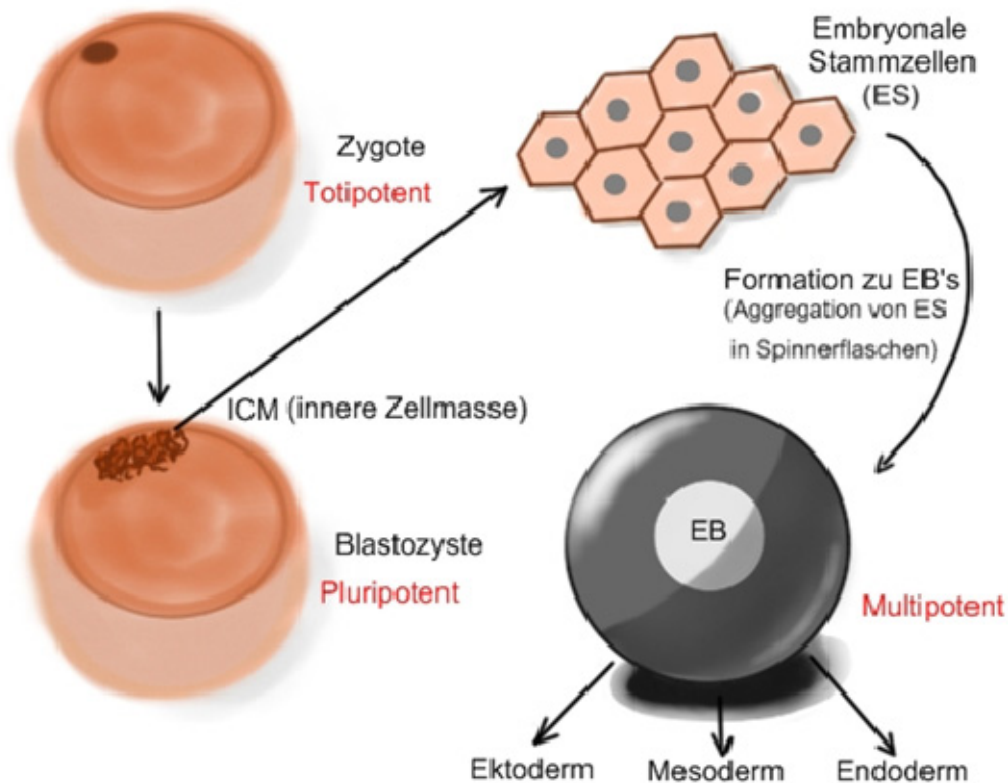


Abb. 3: Gewinnung und Kultivierung von embryonalen Stammzellen modifiziert nach (Guan, Rohwedel et al. 1999)

3 Zielstellung

Die Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen der Sepsis und die vorgestellten Literaturstellen machen deutlich, dass es trotz weitreichender Forschung bis heute nicht gelungen ist ein geeignetes Therapieschema zu entwickeln, um das multifaktorielle Krankheitsbild der Sepsis in den Griff zu bekommen und die Sterberaten zu minimieren. Aus diesem Grund ist die Sepsis immer noch Bestandteil von Forschungsreihen. Die Studien sollen tierversuchsunabhängig durchgeführt werden, deshalb besteht die Nachfrage nach einem *Invitro*- Modell, an dem sich praktisch die pathophysiologischen Grundlagen der Sepsis nachvollziehen lassen und neue Therapieansätze getestet werden können. In dieser Arbeit wird der EB als Modellsystem vorgestellt. Ein leistungsfähiges Modell, da der EB, wie aus den Quellenangaben deutlich wird, in der Lage ist, Zellen des angeborenen Immunsystems und Wege der physiologischen Abwehrmechanismen von Pathogenen *invitro* nachzuahmen. Der EB könnte sich eventuell als Forschungsmodell der Sepsis etablieren.

In dieser Arbeit werden folgende Punkte bearbeitet und soweit möglich in Vergleich zu *in vivo* gewonnenen Proben gesetzt:

- Nachweis molekularbiologischer Prozesse der Sepsis sekundär an gewebetypischen Zellverbänden im Sinne schlagender Areale von differenzierten Kardiomyozyten
- Isolation von gewebespezifischen durch inflammatorische Prozesse aktivierte Immunzellen (F4/80+ Zellen / ggf. residente Zellen)
- Abschätzung der Immunkompetenz der differenzierten phagozytotisch aktiven Zellen im System differenzierter embryonaler Stammzellen der Maus
- Residente CD11b+-Zellen als eventuelle ROS-Quelle bei der septischen Kardiomyopathie

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage BP 221S	Sartorius AG, D.
Ausgießstation, Paraffin EG 1160	Leica, D.
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson GmbH, D.
Elektrophoresekammer Agagel Midi Wide	Biometra GmbH, D.
Geldokumentationsanlage G: BOX EF	Syngene, United Kingdom
Gefriermikrotom CM 3050	Leica Microsystems GmbH, Nussloch, D.
Heizplatte 062	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, D.
Histokinette TP 1052	Leica Microsystems GmbH, Nussloch, D.
Inkubator Hera Cell	Heraeus Instruments GmbH, D.
Inkubator NUAIRE DH Autoflow	INTEGRA Bioscience GmbH, D.
Kompaktschüttler KS 15A mit Inkubationshaube TH15	Edmund Bühler GmbH, D.
LAS 300	Fujifilm, Düsseldorf, D.
Laser Scanning Mikroskop cLSM510Meta	Carl Zeiss AG, D.
Lichtmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss AG, D.
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, D.
Mikrowelle	Bosch, D.
Mini-Protean Tetra Cell	BioRad, München, D.
Mini Trans-Blot®	BioRad, München, D.
pH-Meter	WTW GmbH, D.
Pipetboy acu	INTEGRA Bioscience GmbH, D.
Rotationsmikrotom RM 2165	Leica Microsystems GmbH, Nussloch, D.
Rotor-Gene Q	Qiagen GmbH, D.
Spinnerflaschen IBS Cellspin	INTEGRA Bioscience GmbH, D.
Spinnerflaschen-Rührsystem Cellspin	INTEGRA Bioscience GmbH, D.
Standard Power Pack P25 für Elektrophorese	Biometra GmbH, D.
Sterilbank HERAsafe	Thermo Fisher, Scientific Inc., USA
Steuergerät HT 200W für Heizsystem	Minitüb GmbH, D.
Tecan Sunrise (Microplate Reader)	Tecan Trading AG, Switzerland
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International GmbH, D.
UV/Vis-Spektralphotometer (Nanodrop)	Peqlab Biotechnologie GmbH, D.
UV-Lampe	Biometra GmbH, D.
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus	Bandelin Electronic GmbH, Berlin, D.
Vortexer Vortex-Genie 2	VWR International GmbH, D.
Wasserbad GFL 1092/1052	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, D.
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, D.
Zentrifuge EBA 12	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, D.
Zentrifuge Universal 30 RF	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, D.

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24-well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Bakterielle Petrischalen (6cm)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Descosept	AF Dr. Schuhmacher GmbH, Deutschland
Dakopen	Dako, Deutschland
FACS- Röhrchen Falcon TM (5ml)	VWR International GmbH, Deutschland
Filtertips (10,100,200,1000 µl)	Nerbe Plus GmbH, Deutschland
Filtrationseinheit Stericup	Millipore Corporation, USA
Latex Handschuhe Sensiclean Micro-Touch	Ansell GmbH, Deutschland
PCR- Reaktionsgefäße (200,500 µl)	BRAND GmbH & Co KG, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 100, 200 ,1000 µl)	BRAND GmbH & Co KG, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5ml; 0,5ml)	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Roti-Mount-Aqua	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Serologische Pipetten (10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Strip Tubes and Caps 0,1ml	Qiagen GmbH, Hilden, D
Tissue Freezing Medium	Leica Microsystems GmbH, Nussloch, D.
Tissue Unikassetten	Leica Microsystems GmbH, Nussloch, D.
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zellkulturschale	TPP AG, Schweiz
Zellsieb BD Falcon Cell Strainer	Omnilab GmbH & Co. KG, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Microtome Blades C35 Type	Feather LTD, Japan
Objektträger Superfrost plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D.
Deckgläser 24x60 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D.

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemiekalien/Reagenzien	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH, Deutschland
Agarose	Amresco Inc., USA
L (+)- Arabinose	Sigma- Aldrich, München, D
Basal Isocove Medium ohne Glutamin	Biochrom AG, Berlin D
β-Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich, München, D
DAB (3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
DNase I Reaktion Buffer (10x)	Invitrogen GmbH, Deutschland
DNase Amplifikation Grade (100U)	Invitrogen GmbH, Deutschland
dNTP Mix (10mM)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Dimethylsulfoxid [DMSO]	Sigma-Aldrich, München, D
Eosin Färbelösung	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

-Material und Methoden-

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Fötale Kälberserum [FBS]	Sigma- Aldrich, München, D
Gelatine	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Glasgow Minimal Essential Medium [GMEM]	Invitrogen GmbH, D
Hämatoxylin Färbelösung	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D.
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
L- Glutamin	Biochrom, Berlin, D
Leukämia Inhibitory Factor [LIF]	Biochrom, Berlin, D
Kollagenase NB 4G	Serva GmbH, Duisburg, D.
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Na-Citratpuffer pH 9 (10x)	Dako, Deutschland
Paraformaldehydlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Quanti Fast SYBR® Green RT Master Mix	Qiagen GmbH, Deutschland
Randomprimer (250ng)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Red Load Taq Master	Jena Bioscience, Deutschland
RNase freies Wasser	Invitrogen GmbH, Deutschland
TBE-Puffer (100x)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tween	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
0,25% Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen GmbH, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

4.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1% PBS-T	1% Triton X-100 in PBS
0,01% PBS-T	1 ml 1% PBS-T auf 100 ml PBS
2% PBS-FBS	2% FBS in PBS
10% Milchlösung	10% Milchpulver in 0,01% PBS-T
1xTBE-Puffer	10 ml 10xTBE-Puffer auf 100 ml Aqua dest.
4% PFA-Lösung	4% PFA-Lösung (37%) in PBS
FACS-Puffer	200 µl FBS auf 10 ml PBS
Gelatine-Lösung	0,1% Gelatine in PBS
Methanol/Aceton-Lösung	Methanol:Aceton-Gemisch 7:3
PBS	0,8 g Natriumchlorid 0,02 g Kaliumchlorid 0,144 g Natriumhydrogenphosphat 0,24 g Kaliumhydrogenphosphat ad 100 ml Aqua dest. pH 7,4

4.1.5 Zellkultur

4.1.5.1 Zelllinien

Tab.1: CGR8- Zelllinie

Zelllinie	Bezeichnungen	Firma
CGR8	Murine embryonale Stammzelle	European Collection of Cellcultures, ECACC

4.1.5.2 Medien, Medienzusätze und – zusammensetzungen

Tab.2: Zusammensetzung des CGR8-Proliferationsmedium [LIF]-Medium

Medium	Bestandteile
CGR8-Proliferationsmedium ([LIF]- Medium)	25ml GMEM 2,5ml hitzeinaktiviertes, steril-filtriertes FBS 250µl L-Glutamin 250µl LIF (105 U/ml) 12,5µl Mercaptoethanol-Arbeitslösung (Stock: 70,4 µl β-Mercaptoethanol in 10 ml PBS)

Tab.3: Zusammensetzung des CGR8-Einfriermediums

Medium	Bestandteile
CGR8- Einfriermedium	45ml CGR8-Differenzierungsmedium 5ml DMSO

Tab.4: Zusammensetzung des CGR8-Differenzierungsmediums

Medium	Bestandteile
CGR8- Differenzierungsmedium (Komplettmedium)	500ml Basal Isocove Medium ohne Glutamin 100ml hitzeinaktiviertes, steril-filtriertes FBS

4.1.6 Kultivierung der Bakterien

Tab.5: Bakterien

Bakterienstamm	Bezeichnung
Escherichia coli [E.coli]	K-12 MG1655

4.1.7 Anzucht der Bakterien

Tab.6: LB- Agarmedium

Substanz	LB-Agarmedium
5,5 ml LB-Medium	Life technologies, Darmstadt, D.
500µl Arabinose	
60µl GFP-E.coli	
11µl Ampicillin (1:500)	

4.1.8 Infektion der Stammzellen mit GFP+ E.coli

Tab.7: Zusammensetzung des Infektionsmediums

Substanz	Volumen
CGR8 Kompletmedium	15ml
GFP+ E.coli	10µl
Arabinose	1,5ml

4.1.9 Histologie

Tab. 8: Verwendete Verdünnung von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen

Primärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Hase gegen Maus NOX2	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Ziege gegen Hase Alexa 633	1:200	Millipore, Schwalbach, D.

4.1.10 Immunologische Messverfahren

4.1.10.1 Immunfluoreszenzfärbung

Tab.9: Antikörper für Immunfluoreszenz

Primärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Ratte gegen Maus CD45	1:100	Millipore, Schwalbach, D.
Ratte gegen Maus F4/80	1:100	AbD Serotec, Düsseldorf, D.
Ratte gegen Maus CD11b	1:100	Becton Dickinson Pharmingen, Heidelberg, D.
Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Ziege gegen Ratte Cy5-gekoppelt	1:100	Chemicon International Inc.,USA

4.1.11 Durchflusszytometrie

Tab.10: Antikörper für FACS- Analysen

Primärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Ratte gegen Maus CD45	1:200	Millipore, Schwalbach, D.
Ratte gegen Maus F4/80	1:200	AbD Serotec, Düsseldorf, D.
Ratte gegen Maus CD11b	1:200	Becton Dickinson Pharmingen, Heidelberg, D.
Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Ziege gegen Ratte Cy5	1:200	Chemicon International Inc., USA

4.1.12 Nukleinsäureanalytik

Tab.11: RNA-Extraktion

Material	Firma
Flüssiger Stickstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Trizol (KS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Chloroform (KS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Isopropanol (-20°C)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
RNAse freies Wasser	Invitrogen GmbH, Deutschland

Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide sind aus der Internetdatenbank von www.pubmed.com herausgesucht worden und bei der Firma Sigma-Aldrich, München, D. erworben worden.

Tab.12: Primer

Gen	Primer Sequenzen (F= forward, R=reverse)	
F480 mouse	F	5'-TCT-GGG-GAG-CTT-ACG-ATG-GA
	R	5'-GAA-TCC-CGC-AAT-GAT-GGC-AC
F480 1 mouse	F	5'-CTGAACATGCAACCTGCCAC
	R	5'-GGTGGGACCACAGAGAGTTG
CD11b mouse	F	5'-CCA-CAC-TAG-CAT-CAA-GGG-CA
	R	5'-AAG-AGC-TTC-ACA-CTG-CCA-CC
CD11b 1 mouse	F	5'-GTC-AGT-GTG-TCC-CTT-GCC-TC
	R	5'-CAT-TCA-CGT-CTC-CCA-GCA-CT
CD68 mouse	F	5'-CTT-AAA-GAG-GGC-TTG-GGG-CA
	R	5'-ACT-CGG-GCT-CTG-ATG-TAG-GT
CD68 1 mouse	F	5'-GGG-GCT-CTT-GGG-AAC-TAC-AC
	R	5'-GTA-CCG-TCA-CAA-CCT-CCC-TG

4.1.13 Proteinanalytik

Tab.13: Antikörper für Western blot Verfahren

Primärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Hase gegen Maus NOX2	1:100	Abcam, Camebridge,UK
Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Firma
Ziege gegen Hase HRP-gekoppelt	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg, D

SDS-Probenpuffer

0,5M Tris pH=6,8	2,5ml
10% SDS	2,0ml
99% Glycerol	1,0ml
Harnstoff	3,6g
Bromphenolblau	10mg
DTT	500mg
Aqua bidest	10ml

5x SDS-Page-Laufpuffer

Tris Base	25mM
Glycin	200mM
10% SDS	0,1%

10x Transferpuffer

Tris	25mM
Glycin	192mM

Stripping Puffer

β-Mercaptoethanol	100mM
SDS	2%
Tris-HCl pH=6,8	6,25mM

4.1.14 Inhibitoren**Tab.14: Inhibitoren**

Inhibitor	Hersteller
Cytochalasin D (1-MG)	Sigma- Aldrich, München, D

4.1.15 Kits**Tab.15: Kits**

Kit	Firma
Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammatory Kit	Becton, Dickinson and Company, USA
Mouse Procalcitonin, PCT ELISA Kit	NovaTeinBio, Inc., USA
Mouse Troponin ELISA Kit	Cusabio, China

4.1.16 Software**Tab.16: Software**

Software	Hersteller
EndNote®	Thomson Reuters, USA
LSM Image Examiner®	Carl Zeiss AG, Deutschland
Rotor Gene Software®	Qiagen GmbH, Deutschland
GraphPad InStat® 3	GraphPad Software, USA
LSM510 Software	Carl Zeiss AG, Deutschland
Microsoft® Office	Microsoft Corporation
Nanodrop®	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur: CGR8-Zelllinie

4.2.1.1 Kultivierung undifferenzierter muriner embryonaler Stammzellen

In dieser Arbeit wurde mit Zellen der embryonalen murinen CGR8-Zelllinie gearbeitet. Diese Zellen lagen in gefrorener Form vor und mussten vor der Kultivierung aufgetaut werden. Das Auftauen musste schnell geschehen, da das im Einfriermedium (4.1.5.2 Tab.: 3) enthaltene *Dimethylsulfoxid* (DMSO) bei Raumtemperatur zelltoxische Eigenschaften zeigt.

Für den Vorgang des Auftauens wurden 10 ml warmes CGR8-Komplettmedium (4.1.5.2 Tab.: 4) in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. In Zellkulturflaschen, die mit 0,1 % Gelatine beschichtet waren, wurde 4 ml *leukemia inhibitor factor* (LIF)-Medium (4.1.5.2 Tab.: 1) vorgelegt und erwärmt. Dabei verhindert das LIF-Medium die Ausdifferenzierung der Zellen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dann bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde jeden Tag durch 5 ml frisches LIF-Medium ersetzt und die Zelldichte unter dem Mikroskop begutachtet. Bei einer Konfluenz von ca. 70-80 % musste der Zellrasen durch enzymatische Verdauung abgelöst und in Suspension gebracht werden. Der Ablösevorgang wird durch die Serinprotease Trypsin in Kombination mit EDTA realisiert. Zum Start des Ablösevorgangs wurde zuerst das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und diese mit 1 ml 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung (37 °C) gewaschen. Danach wurden die Zellen solange mit 1 ml 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis die Zellen vom Boden dissoziieren. Ein zusätzliches mechanisches Ablösen durch leichtes Klopfen der Zellkulturflasche treibt diesen Vorgang zusätzlich voran. Zur Vereinzelung der Zellen wurde die Suspension mindestens 10- mal mit der Pipette tituiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 2 ml CGR8-Komplettmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde 4 min bei 800 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in neuem LIF-Medium resuspendiert. 3-5 Tropfen der Suspension wurden in die vorbereitete Zellkulturflasche überführt.

4.2.1.2 Kultivierung von EBs (Embryoid bodies) in der Spinnerflasche (SF)

Entsprechend dem Passagievorgang wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70-80 % aus der Zellkulturflasche abdissoziiert und ca. 10 Mio. Zellen in eine SF mit 125 ml CGR8-Komplettmedium (37 °C) überführt. Die SF wurde nach 24 h auf 250 ml Komplettmedium aufgefüllt. Es fand dann ein täglicher Wechsel von 100 ml Medium statt.

Die SF wurde mit einem Rührsystem bei 22,5 RMP, 1440° Drehungswinkel, 5 % CO₂, wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C in einem Inkubator kultiviert. Die EBs wurden 4 Tage in der SF kultiviert.

4.2.1.3 Ausplattieren der EBs

Zum Ausplattieren der EBs wurden je nach Versuch in Petrischalen 5 ml und in 24-Well-Platten 1 ml CGR8-Kompletmedium (37 °C) vorgelegt. Die SF wurde hierzu aus dem Rührsystem entfernt. Nach kurzer Zeit sedimentierten die EBs am Boden. Mit einer Pipette wurden ca. 10-15 EBs pro Petrischale und ca. 5 EBs pro Well einer 24-Well-Platte verteilt. Das Medium wurde täglich komplett ausgetauscht. Nach ungefähr 7 Tagen Kultivierung wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf ihre Differenzierung zum Kardiomyozyt (schlagende Areale sichtbar) geprüft. War das spätestens nach 9 Tagen nicht der Fall wurden diese Zellen verworfen. Alle gut differenzierten Zellen wurden insgesamt für 18 Tage kultiviert.

4.2.2 Gewinnung der *In vivo*- Proben von Mäusen

Bestandteil dieser Arbeit sind Versuche an Mäusen, um Serumproben und Herzgewebe aus *in vivo* Verhältnissen mit den *in vitro* Verhältnissen der murinen CGR8-abgeleiteten Stammzellen unter septischen Bedingungen zu vergleichen. Die Mäuse wurden dafür in 3 Gruppen aufgeteilt: PCI (Peritoneal Contamination and Infection)-Mäuse, Sham-Mäuse und Kontroll-Mäuse. Bei den PCI-Mäusen wurde mit einer humanen Faeces-Suspension, die intraperitoneal und gewichtsadaptiert (10 µl pro g/KG) appliziert wurde, die Sepsis induziert. Es wurden zusätzlich Sham-Mäuse und Kontroll-Mäuse mitgeführt, um eventuelle haltungsbedingte Stressveränderungen in den Proben auszuschließen. Die Sham-Mäuse erhielten eine intraperitoneale 0,9 % NaCl-Applikation, die vom Volumen der PCI-Faeces-Suspension von 10 µl pro g/KG entsprach. Die Kontroll-Mäuse erhielten keinerlei Applikationen. 6 h nach der Sepsis- bzw. 0,9 % NaCl-Induktion, zum Zeitpunkt des maximalen Zytokinsturms, wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und am offenen Brustkorb durch Herzpunktion das Serum gewonnen. Die Entnahme der Herzen erfolgte post mortem.

4.2.2.1 Serum

Pro PCI-Maus konnten je nach Erkrankungsschwere 0,10 bis 0,15 ml Serum bei Sham- und Kontroll-Mäusen zwischen 0,10 und 0,50 ml Serum gewonnen werden. Das Serum wurde nach Gewinnung in Eppendorfgefäße überführt und bis zur Durchführung der Versuche bei -80°C gelagert.

4.2.2.2 Herzgewebe

Das Herz wurde gedrittelt und für die unterschiedlichen histologischen Untersuchungen verschieden verarbeitet (4.2.5). Für die spätere RNA- Isolation wurde die Gewebeprobe in Aluminiumfolie eingewickelt und bei -80 °C gelagert (4.2.8).

4.2.3 *Green/Red fluorescenc protein (GFP/RFP)-Bakterien*

4.2.3.1 Elektroporation und Integration des GFP/RFP-tragenden Plasmids

Den in dieser Arbeit verwendeten Bakterien wurde durch Elektroporation und Integration ein GFP/RFP-tragenendes Plasmid mit einer Ampicillinresistenz in ihr Erbgut integriert. GFP ist ein fluoreszierender Farbstoff, der aus einer Quallenart, der *Aequorea victoria*, gewonnen wird. Dadurch wird es möglich, die Bakterien durch Anregung des Farbstoffs mit hilfe des cLSM sichtbar zu machen. Die Emissionswellenlänge von GFP liegt bei 509 nm. Beim RFP handelt es sich um einen biologischen Marker, der zur Darstellung transgenetischer Expressionen *in vivo* genutzt wird. Die Emissionswellenlänge von RFP beträgt 588 nm. Die Elektroporation ist ein gängiges Verfahren zur Permeabilisierung der bakteriellen Zellmembran. Die Permeabilisierung ist notwendig, damit große Moleküle, wie hier das GFP-tragende Plasmid, in das Bakterium eingeschleust werden können. Dieser Vorgang wird bei Prokaryonten als Transformation bezeichnet. Bei den sich in die chromosomale DNA des Wirts integrierende Plasmide handelt es sich um sogenannte Episome. Sie werden bei jeder Zellteilung repliziert und können auch als nicht-integrierte Plasmide lange Zeit im Bakterium verbleiben.

4.2.3.2 Anzucht und Selektion der GFP/RFP-tragenden Bakterien

Die Bakterien wurden zuerst in flüssigem LB-Medium angezüchtet und dann auf Agarplatten ausgestrichen. Die Selektion von GFP⁺-Kolonien erfolgte mit bloßem Auge oder unter dem Mikroskop mit Hilfe von UV-Licht.

4.2.3.3 Infektion der murinen differenzierten Stammzellen

Die murinen CGR8-abgeleiteten Stammzellen wurden an Tag 18 mit 5 ml des Infektionsmediums (4.1.8) versetzt und je nach Versuchsaufbau unterschiedlich lange inkubiert. In den Versuchen wurde eine *Multiplicity of infection* (MOI) von 2 verwendet. Die MOI beschreibt das Verhältnis von den infizierenden Bakterien zu den Zielzellen. In diesem Versuch wurden also doppelt so viele Bakterien eingesetzt, wie sich Zellen in der Kultur befanden. Dies entspricht einer niedrigen initialen Infektionsdosis.

4.2.4 Semiquantitativer Nachweis von Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

4.2.4.1 Fluorimetrisches Assay an EBs nach Exposition mit Sepsis-Serum

ROS wurde mit Hilfe von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat nachgewiesen. Nach Aufnahme von 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat in die Zelle wird durch intrazelluläre Esterasen die Acetatgruppe hydrolysiert. Dabei entsteht das nicht fluoreszierende Dichlorodihydrofluorescein, das mit ROS zum fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Der semiquantitative Nachweis erfolgte mit Hilfe des cLSM durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm.

4.2.5 Histologie

4.2.5.1 Gewebeproben für Kryoschnitte

Die Herzpräparate zur kryostatischen Schnittherstellung wurden unfixiert in Tissue-Tec-Einbettmittel bei - 80°C eingefroren. Zur Schnittherstellung wurden die Proben aufgetaut und mit Hilfe von TissueTec-Eindeckmedium auf Metallblöckchen aufgefroren und Schnitte von 8 µm angefertigt und auf den Objektträger (OT) aufgezogen

4.2.5.2 Aufarbeitung der Gewebeproben für Paraffineinbettung

4.2.5.2.1 *Fixierung*

Die Herzpräparate wurden in Tissue-Tec-Unikassetten überführt und in 4 % Formalin für 24 h fixiert, um postmortale Vorgänge aufzuhalten und das Herauslösen von Zellbestandteilen zu verhindern. Durch das Formalin bilden sich Methylbrücken zwischen freien Aminosäuren. Dies führt zur Quervernetzung der Proteine.

4.2.5.2.2 *Paraffineinbettung und Schnitterfertigung*

Die Entwässerung der formalinfixierten Präparate erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (2 x 70 %, 2 x 96 %, 3 x 99 % Ethanol). Danach wurden die Präparate zweimal für je 4 h in Xylol und dann zweimal je 2 h in flüssiges Paraffin überführt. Die Schritte der Entwässerung und Überführung in Paraffin erfolgten über Nacht automatisch mit der Histokinette. Am nächsten Tag wurden die Präparate am Ausgießautomaten mit Paraffin übergossen. Nach Erkalten waren die Paraffin-Blöcke schnitterfertig. Am Rotationsmikrotom wurden Schnitte zwischen 4-11 µm angefertigt und auf den OT aufgezogen.

4.2.5.3 Färben der Gewebeproben

4.2.5.3.1 *Immunhistochemie*

Die Immunhistochemie wurde in dieser Arbeit nur an kryostatisch hergestellten Schnitten (4.2.5.) durchgeführt, um die vermehrte Bildung von H₂O₂ unter septischen Bedingungen am Herzgewebe der Maus darzustellen . Zur Visualisierung der Peroxidaseaktivität wurde das 3',3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) Enhanced Liquid System (Sigma-Aldrich, Deutschland) verwendet. Am Kryostaten wurden aus dem Herzgewebe 8 µm Schnitte angefertigt und auf einen OT gezogen. Das DAB-System wurde nach Herstellerangaben verwendet. Pro Schnitt wurden 300 µl der hergestellten Lösung auf den Schnitt gegeben und 5 min inkubiert. Danach wurde der Schnitt gewaschen und für 10 min in 4 %- PFA-Lösung fixiert, in 0,01 % PBS-Lösung überführt und eingedeckt. Das Prinzip dieser Reaktion beruht darauf, dass H₂O₂ der Proben mit dem Chromagen des DAB-Systems Manganoxidhydroxid bildet. Dieses fällt als brauner Niederschlag in alkalischem Milieu aus:



Am Lichtmikroskop wurden bei identischen Kameraeinstellungen Bilder angefertigt. Zur Auswertung wurde das Prinzip des Bildvergleichs genutzt. Bei dem Bildvergleich wurde ein

negatives, ein einfach positives und ein zweifach positives Bild als Vergleichsskala für die angefertigten Bilder der Kontroll-, SHAM- und Sepsis-induzierten Mäuse genutzt.

4.2.5.3.2 *Immunhistofluoreszenz*

Immunhistofluoreszenzfärbungen wurden ausschließlich an Paraffinschnitten (4.2.5.2) durchgeführt. Zuerst erfolgte eine Deparaffinisierung durch zweimal 15 min Xylol. Anschließend erfolgte eine Hydrierung der Schnitte durch die absteigende Alkoholreihe (je 5 min 99 %, 96 %, 70 %, 50 % Ethanol). Danach wurden die Schnitte in 0,01 % PBS-T gelagert. Es erfolgte eine Demaskierung der Antigene durch Na-Citratpuffer pH 9 (10x), da es durch die Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin zur Maskierung von Zielantigenen kommen kann. Dafür wurde der Na-Citratpuffer mit A. dest. 1:10 verdünnt, in eine Küvette gegeben und die Schnitte hineingestellt. In der Mikrowelle wurden die Schnitte bei 900 W zum Kochen gebracht, dann 2 min bei 600 W gekocht und anschließend 15min bei 250W weiter inkubiert. Citratpuffer wurde bei Bedarf nachgefüllt. Danach wurden die Schnitte in der Küvette bei Raumtemperatur 15 min abgekühlt. Danach erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit 0,01 % PBS-T. Die OTs wurden in Feuchtkammern gelegt, das Gewebe mit dem Dakopen eingekreist und die Zellen bei intrazellulären Antigenenfärbungen mit 0,1 % PBS-Tween für 4-6min permeabilisiert. Danach wurden die Schnitte zweimal mit 0,01 % PBS-Triton gewaschen. Es erfolgte ein Blockschrift mit Milchpulver 10 % für 20 min bei Raumtemperatur. Die primären *Antikörper* [AK] wurden in 10% Milchpulver verdünnt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal mit 0,01 % PBS-Triton gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit dem ebenfalls in Milchpulver verdünnten sekundären AK für 1 h bei RT. Danach wurden die Schnitte dreimalig mit 0,01 % PBS-Triton gewaschen und mit Roti-Mount-Aqua-Eindeckmittel luftdicht verschlossen und am cLSM ausgewertet. Es wurden immer Negativkontrollen mitgeführt, bei denen nur der sekundäre AK eingesetzt wurde. Die negativ Kontrollen dienten bei der Auswertung am cLSM als Standard für die Einstellung einer nicht positiven Reaktion. Bei Doppelfärbungen wurden die Schritte (4.2.5.3.2) zweimal durchgeführt.

4.2.6 Immunologische Messverfahren

4.2.6.1 Immunofluoreszenz

Die Methode der Immunofluoreszenz wurde in dieser Arbeit gewählt, um die Leukozytenentwicklung in den differenzierten Stammzellen der Zelllinie CGR8 darzustellen.

Die gesamte Leukozytenpopulation wurde mit CD(Cluster of differentiation) 45. CD 45 hat zwei Isoformen und ist unterschiedlich stark mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert, der auf allen Leukozyten exprimiert wird. Desweiteren wurde F4/80 und CD11b zur Identifizierung der Makrophagen genutzt. Das Verfahren der Immunofluoreszenz beruht auf einer AG-AK-Reaktion. Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche zellspezifische Antigene, d .h., sie haben einen unverwechselbaren Immunphänotyp. Um diese Oberflächenantigene darzustellen, wurden spezielle AK, die gegen diese Oberflächenantigene gerichtet sind, zur Darstellung genutzt. Beim Ausgangsmaterial handelte es sich um Stammzellen, die sich in 24-Well-Platten über 18 Tage differenziert haben und an Glasplatten festgewachsen sind. Vor der Fixierung mit einer 4 % PFA-Lösung (1 h bei 4 °C) wurden die Stammzellen dreimal mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung erfolgt ein dreimaliger Waschschriff mit 0,01 % PBS-Triton. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde mit 10 % Milchpulver für 1 h geblockt. Nach dem Blocken erfolgten wiederum 3 Waschschriffe mit 0,01 % PBS-Triton. Danach wurde der primäre Antikörper, der gegen das zu suchende Epitop gerichtet ist, in Milchlösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper entfernt und es erfolgt ein dreimaliger Waschschriff mit 0,01 % PBS-Triton. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in 10 % Milchpulver verdünnt. Diesem Ansatz wird der Kernfarbstoff Dapi im Verhältnis 1:500 zugesetzt und 1h auf dem Schüttler inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluorochrom besetzt. Die Auswertung erfolgt am cLSM.

4.2.6.2 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Der ELISA dient zum quantitativen Nachweis von Zielproteinen. Es wurden das Mouse Procalcitonin, PCT ELISA Kit (NovaTeinBio, Inc., USA) zum Nachweis von Procalcitonin (PCT) und das Mouse Troponin ELISA Kit (Cusabio, China) zum Nachweis von kardialem Troponin-I [cTn-I] verwendet. Das Prinzip des ELISA beruht auf einer AG-AK- Reaktion. Ein spezifischer AK gegen das Zielprotein ist dabei als feste Phase auf der Mikrotiterplatte aufgebracht. Im ersten Schritt wird die Probe mit dem zu untersuchenden AG in die Wells gegeben und inkubiert. Das nachzuweisende AG bindet in dieser Zeit an den spezifischen AK. Nach der Inkubation erfolgen mehrere Waschschriffe. Im nächsten Schritt wird ein Detektions-AK zugeführt. Dieser richtet sich gegen ein anderes Epitop des nachzuweisenden AG und ist wiederum mit einem enzymmarkiertem AK verbunden. Nach erneuter Inkubation und darauf folgendem Waschschriff wird ein zum Enzym passendes chromogenes Substrat

hinzugefügt. Dieses Substrat kann nur umgesetzt werden, wenn sich ein enzym-linked AK-AG-AK-Komplex gebildet hat. Das Reaktionsprodukt wird durch einen Farbumschlag sichtbar und kann photometrisch ausgewertet werden. Bei den Proben handelt es sich um von Mäusen gewonnenes Serum und um Überstände von mit E. coli infizierten Stammzellen der Zelllinie CGR8. Die Überstände wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 4 h, 6 h, 10 h, 24 h) gewonnen und bis zur Durchführung des ELISA bei -80 °C gelagert. Die Kits wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte anhand einer Standardreihe. Sowohl von den Standards als auch den Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.2.7 Durchflusszytometrische Messverfahren

4.2.7.1 Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)

Das FACS stellt eine Methode zur Charakterisierung und Isolierung von Zellen einer Zellpopulation dar. In dieser Arbeit wurde das FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, D.) genutzt und jeweils 10.000 Zellen analysiert. Zur Vorbereitung der Zellen wurden die in Petrischalen angewachsenen Stammzellen mit 1 ml Kollagenase (2 mg Kollagenase NB 4G auf 1 ml PBS) für ca. 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Kollagenase dient hier dem Ablösen und Vereinzeln der Zellen. Dieser Vorgang wird durch mehrmaliges Tituieren mit einer Pipette unterstützt. Die abgelösten Zellen werden danach filtriert, in Flacons aufgefangen und 4 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml 2 % PBS-FBS resuspendiert.

4.2.7.2 FACS mit Hilfe von Fluorochromen

Bei einem Teil der Versuche wurden Oberflächenantigene mit dem primären AK, der gegen das spezifische AG-Epitop der zu analysierenden Zellenpopulation gerichtet ist, detektiert. Im Zweiten Schritt bindet der mit Fluorochrom maskierte sekundäre AK an den primären AK. Dafür wurden die in PBS-FBS 2 % resuspendierten Zellen 4 min bei 1200 U/min zentrifugiert und danach mit 1 ml 10 % Milchpulver für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde erneut 4 min bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und der in 10 % Milchpulver verdünnte primäre AK für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgte wiederum die Zentrifugation für 4 min bei 1200 U/min, der Überstand wurde verworfen und es erfolgte ein dreimaliger Waschschritt mit PBS-FBS 2 % und anschließender Zentrifugation wie vorher beschrieben. Der Überstand

wurde nach jedem Waschschrift verworfen. Danach wurde der sekundäre AK, der ebenfalls in 10 % Milchpulver verdünnt wurde, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte wie beschrieben ein dreimaliger Waschschrift. Die Zellen wurden nach dem Waschen in 500 µl PBS-FBS 2 % resuspendiert. Es wurden Negativ- und Isokontrollen für jeden Antikörper mitgeführt. Bei der FACS-Analyse fließen die Zellen einzeln durch dünne Messkammern, werden vom Laser angestrahlt und aufgrund der Fluorochrome entsteht ein spezifisches Streulicht. Die Analyse erfolgt mit der FACSCalibur® Software.

4.2.7.3 FACS nach GFP-Signal

Bei anderen Versuchen wird die Phagozytosefähigkeit der Zellen untersucht. Die Stammzellen wurden dabei mit GFP⁺-markierten E. coli infiziert und 2 h/4 h/6 h/ 8h inkubiert. Die Stammzellen wurden dann wie in (4.2.7.1) beschrieben, vorbereitet und mittels FACS nach ihrem GFP-Signal analysiert.

4.2.7.4 Cytometric bead Array (CBA)

Das Cytometric bead Array (CBA, Becton Dickinson, USA) wurde in dieser Arbeit zum Nachweis von inhibitorischen und stimulatorischen Zytokinen verwendet. Es wurde die Zytokinproduktion im Plasma der Mäuse sowie in den Überständen der mit E. coli infizierten Stammzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 4 h, 6 h, 10 h und 24 h) untersucht. Nach Gewinnung der Proben wurden die Überstände bzw. das Plasma bis zur durchflusszytometrischen Untersuchung bei -80 °C gelagert. Der CBA ist eine Methode zur gleichzeitigen Analyse von verschiedenen Zytokinen mithilfe des Durchflusszytometers. Der Test enthält einen spezifischen Antikörper (capture bead) für jedes Zytokin. Während der Inkubation wird der spezifische Antikörper mit einem Phycoerythrin- gekoppelten Farbstoff markiert. Das Durchflusszytometer kann dann aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten die einzelnen Zytokine als getrennte Populationen voneinander abgrenzen. Untersucht wurde die Freisetzung von IL-10, MCP-1, TNF- α , IL-6, INF- γ , IL-12p70. Der CBA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der Zytokine erfolgte anhand einer vom Hersteller vorgegebenen Standardreihe.

4.2.8 Nukleinsäureanalytik

4.2.8.1 RNA-Extraktion

Das Herzgewebe wurde kurzzeitig im flüssigen Stickstoff gelagert. Danach wurde auf 100 mg Herzgewebe 1 ml Trizol gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Trizol diente zur Lyse des Gewebes. Um diesen Vorgang zu unterstützen, wurde das Gewebe zusätzlich zerkleinert. Danach wurden auf 1 ml Trizol 200 µl Chloroform gegeben und wiederum 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach per Hand geschüttelt und 15 min bei 1200 U/min (4 °C) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation entstehen zwei Phasen, wobei die obere hellere Phase die RNA beinhaltet. Die obere Phase wird abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol (eiskalt) versetzt, gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde für 10 min bei 1200 U/min (4 °C) zentrifugiert. Das Isopropanol dient zur Fällung der RNA. Am Boden des Reaktionsgefäßes bildet sich ein Pellet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 75 % Ethanol resuspendiert und 5 min bei 7500 U/min (4 °C) zentrifugiert. Dieser Schritt dient der Reinigung der RNA. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Nach ca. 5 min Trockenzeit wird das Pellet in 15 µl RNase-freies Wasser resuspendiert. Die RNA wird bei -80 °C aufbewahrt oder zu einer Konzentrationsbestimmung herangezogen.

4.2.8.2 Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung

Bevor aus der isolierten RNA cDNA hergestellt werden kann, muss eine photometrische Quantifizierung der RNA erfolgen. Die Bestimmung wird durch das UV/Vis-Spektralphotometer Nanodrop® ND-1000 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D) ermöglicht. Grundlage der Messung ist das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260nm, das hauptsächlich durch die aromatischen Ringe der enthaltenen Basen hervorgerufen wird. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt durch die Schwächung der Strahlung, also durch die optische Dichte, der unbekannten Ribonukleinsäurelösung. Die erwarteten Werte sollten zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, der Mittelwert bestimmt und dieser als Ausgangskonzentration zur Berechnung der für die cDNA-Synthese notwendigen Menge verwendet. Es wurde eine Konzentration von 1 µg RNA auf 10 µl RNase-freiem Wasser hergestellt.

4.2.8.3 cDNA-Synthese

Die DNA-Polymerase, das Enzym der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR), ist nur in der Lage, DNA als Matrize zu verwenden. Aus diesem Grund muss die Ausgangs-RNA in komplementäre DNA (cDNA) durch die Reverse Transkriptase (RTase) umgeschrieben werden. Es wurde das cDNA- Kit M-MLV-Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, D) und der Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, D) verwendet.

Für den Ansatz wird die Lösung von 1 µg RNA auf 10µl RNase freiem Wasser (siehe 4.2.8.2) bereitgestellt. Durch den Reaktionsansatz 1 (Tab.: 17) wurden störende DNA-Fragmente durch DNase-Verdau beseitigt. Im Anschluss wurde diese Reaktion durch das im Reaktionsschritt 2 (Tab.: 17) enthaltene EDTA gestoppt. Der Randomprimer, ein Gemisch verschiedener Oligonukleotid-Sequenzen und die ebenfalls im Reaktionsansatz 2 enthaltenen Nukleosidtriphosphate, sind wichtige Substrate für die darauffolgende Reaktion. Im Reaktionsschritt 3 (Tab.: 17) wurden die Reaktionsbedingungen für die in Reaktionsschritt 4 (Tab.: 17) ablaufende Reaktion verbessert. Beim letzten Schritt wird die M-MLV-Reverse Transkriptase (M-MLV-RTase) beigelegt, die dann die Umschreibung in einen DNA-Doppelstrang durchführte.

Tab. 17: Reaktionsbedingungen der cDNA-Synthese

	Komponenten	Inkubation
Reaktionsansatz 1	1 µl DNase I Reaction Buffer (10x) 1 µl DNase I	15 min bei Raumtemperatur
Reaktionsansatz 2	1 µl EDTA (25 mM) 1 µl Randomprimer (250 ng) 1 µl dNTP-Mix (10 mM)	5 min bei 65°C Kühlung bei 4°C
Reaktionsansatz 3	4 µl First-strand Puffer (5x) 2µl DTT (0,1 M) 1 µl RNase freies Wasser	2 min bei 37°C
Reaktionsansatz 4	1 µl M-MLV-RTase	10 min bei 25°C 50 min bei 37°C 15 min bei 70°C

4.2.8.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation gesuchter Genabschnitte (Mullis, Faloona et al. 1986). Im ersten Schritt der PCR, der Denaturierung, wird der cDNA-Doppelstrang bei 95°C in Einzelstränge aufgebrochen. Danach wird die Temperatur der

Cyclers auf 59°C heruntergefahren. Dabei erfolgt die Anlagerung der Oligonukleotide, der Primer an die Einzelstränge. Sie grenzen die DNA-Region spezifisch ein, die amplifiziert werden soll, indem sie an einem der beiden komplementären Stränge hybridisieren. Bei 72°C lagert sich die Taq-DNA-Polymerase an die Sequenzen an und füllt die noch offenen Lücken. Diese Schritte werden 39-mal wiederholt, so dass eine exponentielle Amplifikation des gesuchten Abschnitts gewährleistet ist. Die PCR wurde in dieser Arbeit zur Testung der Primer und der Intaktheit der cDNA und im weiteren Verlauf zur relativen Quantifizierung von Genabschnitten verwendet. Für die PCR-Reaktion wurde der Red Load Taq Master (Jena Bioscience, D) und der Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, D) genutzt. Als *housekeeping*-Gen wurde *polymerase 2a* verwendet.

Tab. 18: Primer-Mix

Primer Mix: Komponenten	Gesamtvolumen
188µl RNase freies Wasser 6µl Primer forward 6µl Primer reverse	200µl [3µM Lösung]

Tab. 19: PCR-Ansatz

Komponenten	Volumen
cDNA	1µl
Primer-Mix	2µl
RNase freies Wasser	7µl
Red Load Taq Master	10µl
Insgesamt	20µl

Tab. 20: Reaktionsschritte der PCR

Schritt	Inkubation
Initiale Denaturierung	2min bei 94°C
Denaturierung	30s bei 94°C
Annealing	30s bei 60°C
Elongation	30s bei 72°C
Zyklenzahl	39

4.2.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit nur zur Testung der Primer und der cDNA genutzt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch ein 1,5% Agarosegel. Dieses Gel setzte sich aus 1,5g Agarose, 100ml TBE-Puffer und 3,5µl Ethidiumbromid zusammen. Das Gel wird in TBE-Laufpuffer in eine entsprechende Vorrichtung eingespannt, die Proben und ein DNA-Größenstandard werden in die Probentaschen pipettiert. Nach Anlegen der Spannung von 100V für ca. 40min wandern die DNA-Produkte entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld. Durch den pH-Wert des Puffers liegen die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren negativ geladen vor, d. h. die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist nur von der Molekülgröße abhängig. Der DNA-Größenstandard dient später zur zuverlässigen Bestimmung der Nucleinsäuren. Das hinzugefügte Ethidiumbromid interkaliert in der DNA und erhöht das Anregungsspektrum im UV-Licht. Es erscheint eine helle Bande anstelle der Nukleinsäuren. Die Banden wurden mit dem Geldokumentationsverfahren G:BOX EF® bei UV-Licht visualisiert. Die Lichtintensität ist proportional der Konzentration. Es ist daher möglich, semiquantitative Bestimmungen von PCR-Produkten vorzunehmen.

4.2.8.6 *Real-time-PCR* [RTD-PCR]

Die RTD- PCR ist eine Echtzeit-PCR zur quantitativen Amplifikation von PCR-Produkten. Es wurde das Rotor-Gene SYBR® Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, D) und der Cyclex Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, D) verwendet.

Bei der Real-time PCR werden Fluoreszenzfarbstoffe, wie in dieser Arbeit das SYBR® Green, verwendet. Bei diesen Farbstoffen handelt es sich um interkalierende Substanzen. Sobald ein DNA-Doppelstrang während der Denaturierungsphase in einen Einzelstrang zerfällt, bindet der Fluoreszenzfarbstoff an der DNA und sendet ein Fluoreszenzsignal aus. Die Messung erfolgt am Ende der Elongation von jedem Zyklus. Das Signal nimmt mit steigender Anzahl der PCR-Produkte proportional zu und ermöglicht so eine Quantifizierung. Zur Auswertung wird zuerst eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Spezifische Doppelstrang-DNA hat dabei einen höheren Schmelzpunkt als unspezifische Primerdimere. Durch die Schmelzkurvenauswertung können also unspezifische Fluoreszenzsignale von Primerdimeren ausgeschlossen werden. Die numerische Auswertung erfolgt über eine relative Quantifizierung unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode (Livak and Schmittgen 2001). Als Standard bzw. *housekeeping*-Gen dient die DNA-Polymerase, die über die Zeit bei allen Herzen der Maus stabil exprimiert wurde. In Tabelle Nr. 21 und Nr. 22 sind die Komponenten und Reaktionsbedingungen veranschaulicht.

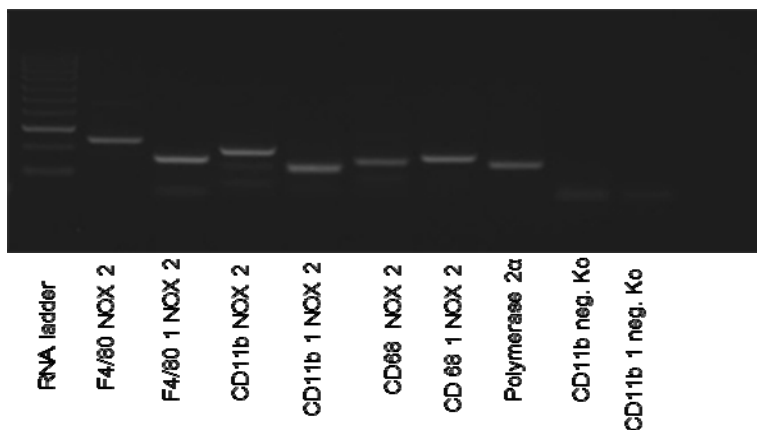
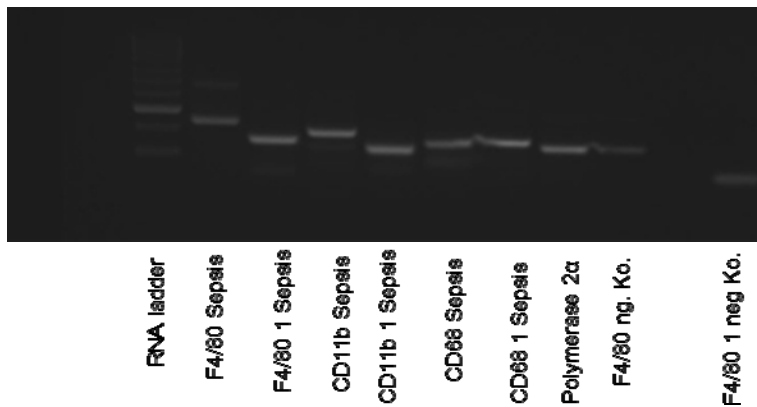
Tab. 21: Real-time PCR-Ansatz

Komponenten	Volumen
cDNA	1µl
Primer-Mix	2µl
RNase freies Wasser	7µl
SYBR® Green RT-PCR Kit	10µl
Insgesamt	20µl

Tab. 22: Reaktionsbedingungen für die Real-time PCR

Schritt	Zeitspanne	Temperatur	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	5min	95°C	1x
Denaturierung	15s	95°C	40x
Annealing- und Elongationsphase	30s	59°C	
Schmelzkurve		95°C 60°C 95°C	1x

4.2.8.7 Primer und Housekeeping



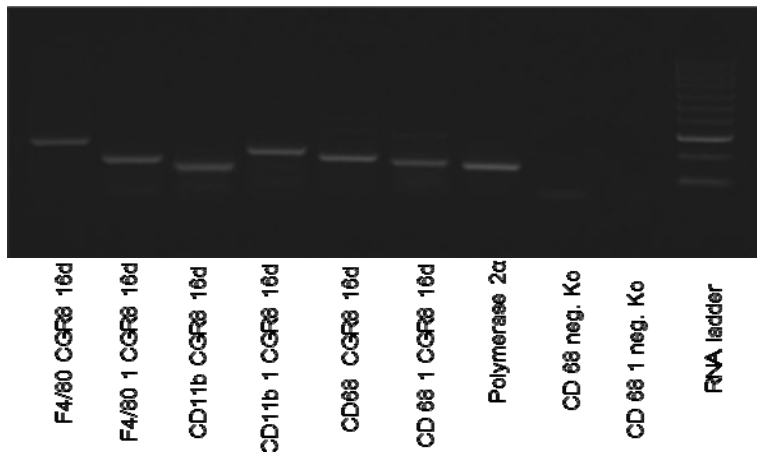


Abb. 4: Visualisierung der Primertesting zur Bestimmung der mRNA-Expression
Positiv Kontrolle: mRNA 16d kultivierter CGR8-Zellen, Negativ Kontrolle: Rnase-freies Wasser. Bei der realtime PCR zur mRNA-Expression wurden die Primer F4/80, CD68 1 und CD 11b 1 verwendet

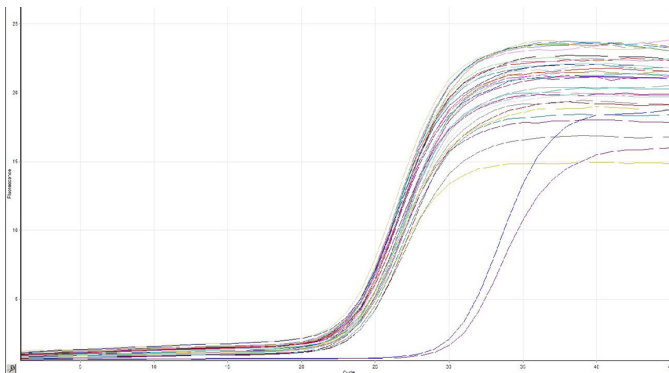


Abb. 5: Polymerase 2α (Housekeeping-Gen) (Treshold 0,2)

4.2.9 Proteinanalytik

4.2.9.1 Proteinisolation und Proteinkonzentrationsbestimmung

Am Anfang der Proteinbestimmung mittels Westernblot steht die Proteinisolation. Hierzu wurden ca. 30-50 EBs der Zelllinie CGR8 am Tag der Untersuchung aus der Spinnerflasche entnommen und mit E. coli 0 h, 6 h und 10 h koinkubiert. Die EBs wurden nach Koinkubation dreimal mit 1 ml PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Die Freisetzung der Proteine erfolgte durch mechanische Homogenisierung. Um die Proteine dabei in Lösung zu halten, wurden die EBs nach dem Waschen in 250 µl eiskalten HPI-Puffer überführt. Der HPI-Puffer enthält Inhibitoren, die proteolytische Enzyme in ihrer Aktivität hemmen und so die biologische Aktivität der Proteine erhalten. Die Freisetzung der Proteine erfolgte mit dem Ultraschall-Homogenisator Sonoplus (BANDELIN Electronic GmbH, Berlin) über dreimal 10 s bei 30 % Leistung und 4° C Umgebungstemperatur. Um Zelltrümmer abzutrennen, erfolgte danach die Zentrifugation bei 10.000 U/min für 12 min bei 4 °C. Die zur weiteren

Untersuchung benötigten Proteine befanden sich im Überstand. Der Überstand wurde abpipetiert und bis zur photometrischen Proteinkonzentrationsbestimmung bei -80°C zwischengelagert. Die Konzentrationsbestimmung der gelösten Proteine erfolgte nach Bradford. Bei diesem Verfahren macht man sich zu Nutze, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit Proteinen Komplexe bildet und sich dabei das Absorptionsmaximum von 465 nm in Richtung 595 nm verschiebt. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums kommt dadurch zustande, dass der Farbstoff in saurerer Lösung in kationischer Form vorliegt, während nach Interaktion mit Proteinen die anionische Form stabilisiert wird. Die quantitative Analyse erfolgt mit Hilfe einer BSA-Standardreihe in einer 96-Well-Platte. Das Verhältnis von Bradford-Reagenz zur Probe betrug 1:20. Die photometrische Auswertung erfolgte in Dreierbestimmung.

4.2.9.2 Diskontinuierliche SDS-Page

Die diskontinuierliche SDS-Page dient zur Auftrennung der Proteine. Diskontinuierlich bezieht sich in diesem Fall einerseits auf die unterschiedlichen pH-Werte andererseits auf die unterschiedlichen Porengrößen von Trenn- und Sammelgel. Die verwendeten Matritzen sind auf Polyacrylamidbasis und in ihrer Zusammensetzung in Tab. 23 exemplarisch dargestellt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem Mini-Protean Tetra-Cell (Bio-Rad, München, Deutschland). Die Proteine werden mit PBS verdünnt, mit 40 % SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 90 °C denaturiert, um eine Linearisierung der molekularen Struktur zu erreichen. Das DTT im SDS-Puffer spaltet Disulfidbrücken. Durch das SDS werden die Proteine mit einer gleichmäßigen negativen Ladung umhüllt. Die hergestellten Gele werden in das Tanksystem mit SDS-Laufpuffer gegeben. In die Taschen werden 35µl eines Proteingrößenstandards und das Protein pipettiert. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 120 V angelegt. In dem Sammelgel kommt es zur Akkumulation der Proteine, während es bei dem Trenngel zu einer Separierung der Proteine kommt.

Tab. 23: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Komponenten	12% Trenngel	10% Trenngel	4% Trenngel
40% Acrylamid	4,5ml	3,75ml	1,5ml
1,5M Tris-HCL pH=8,8	3,75ml	3,75ml	-
0,5M Tris-HCL pH=6,8	-	-	1,87ml
10% SDS	150µl	150µl	75µl
10% APS	150µl	150µl	75µl

td H₂O	6,45ml	7,20ml	4ml
TEMED	10µl	10µl	5µl
Volumen	15ml	15ml	7,5ml

4.2.9.3 Westernblot-Tankblotting

Basierend auf dem Elektrobloottingverfahren werden hier beim Westernblot Proteine nach der Standardapertur Mini-Trans-Blot® (Bio-Rad, München, Deutschland) transferiert. Durch ein senkrecht zu dem Gel angelegten elektrischen Feld werden die durch die SDS-Page nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. In einem Sandwich werden Gel und Membran nach dem Schema Schwamm-Filterpapier-Membran-Gel-Filterpapier-Schwamm aufgebaut. Alle Bestandteile werden vorher in Transferpuffer eingelegt. Das in dem Puffer enthaltene Methanol sorgt für eine bessere Anhaftung der Proteine an der Membran. Das Sandwich wird in eine Kassette gelegt, in den Tankblot eingespannt, mit auf 4 °C temperierten Transferpuffer aufgefüllt und an eine Spannung von 20 V für 12 h bei 4 °C angeschlossen.

4.2.9.4 Immundetektion und Strippen der Membran

Durch ein AG-AK-Bindungsprinzip gelingt der Nachweis des gesuchten Proteins. Hierzu wurde die Membran für 4 h bei 4 °C in 4 % Milchlösung gelegt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgt ein zweimaliger Waschschrift mit 0,1 % PBS-T. Die Membran wurde dann über Nacht mit dem primären AK, gelöst in Milchlösung, bei 4 °C inkubiert. Um den umgebundenen primäre AK abzulösen erfolgte ein dreimaliger Waschschrift von je 20 min bei 4 °C mit 1 % PBS-T. Anschließend wurde die Membran 1 h bei 4 °C mit dem sekundären AK inkubiert und danach erneut dreimalig für 20 min mit 1 % PBST-gewaschen. Der sekundäre AK ist ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter AK (HRP-gekoppelt), der mit seinem Substrat Luminol Licht blauer Wellenlänge emittiert. Dieses Licht wurde dann mit dem LAS 300 (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) detektiert. Durch das Strippen der Membran wurde der AG-AK-Komplex von der Membran heruntergelöst und damit einer nochmaligen Immundetektion zugänglich gemacht. Die Membran wurde dafür mit dem Stripping-Puffer bedeckt und zuerst 30 min bei 65 °C und danach 15 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit 0,1 % PBS-T für 20 min bei 4 °C konnte die Immundetektion mit dem endogenen Standard GAPDH erfolgen.

4.2.10 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (cLSM)

Die fluoreszenztechnischen Untersuchungen wurden in dieser Arbeit mit Hilfe des konfokalen Laser-scanning-Mikroskops 510 Meta (Carl-Zeiss, Jena, D.) durchgeführt.

Das cLSM setzt sich aus einer Lasereinheit, einem Fluoreszenzmikroskop mit Lochblende, Detektoren und einem Computer mit Bildgenerierung und -verarbeitung zusammen. Das Besondere an dieser Art der Mikroskopie ist neben der Möglichkeit der 3D-Darstellung durch die z-Ebene, dass mit Hilfe der drei Detektoren verschiedene Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Strukturen aufgezeichnet und später bei der Verarbeitung übereinandergelegt werden können. Somit bietet diese Methode gerade beim Einsatz fluoreszenzmarkierter AK die Option, mehrere antigene Strukturen gleichzeitig zu visualisieren. Die Anregung erfolgt rasterartig, also Punkt für Punkt. Mit Hilfe der Lochblende ist es möglich, Streulicht und Fluoreszenzsignale anderer Ebenen zu unterdrücken. Dies wird erreicht, indem die Lochblende mit dem Fokuspunkt in einer Ebene, also konfokal, liegt.

4.2.11 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem One-way ANOVA Test oder mit dem t-Test. Dargestellt ist der gepoolte Mittelwert (MW) und der gepoolte *standard error of means* (SEM). Dabei stellt n die Anzahl der durchgeführten Experimente dar. Die Signifikanzen sind in den Abbildungen dargestellt mit: * = $p < 0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 Spontane Differenzierung der murinen EBs in potentiell immunkompetente Zellen

Die Differenzierungsfähigkeit der murinen embryonalen Stammzellen in potentiell immunkompetente Zellen war die wegweisende Untersuchung für die Entstehung dieser Arbeit. Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen an 18 Tage lang differenzierten Stammzellen der Zelllinie CGR8 durchgeführt, um eine qualitative Aussage über die Zellen der humoralen Abwehr innerhalb des *in-vitro* Modells treffen zu können. Zur Darstellung der Zellen wurden AK gegen spezifische Oberflächen-AG der zu untersuchenden Populationen verwendet. Das Oberflächen-AG CD45 wird dabei auf allen Zellen der weißen Reihe in zwei Isoformen unterschiedlich stark expremiert und ist an den T-Zell-Rezeptor gekopplt. Die Oberflächen-AG CD11b und F4/80 werden hauptsächlich auf Makrophagen expremiert. Es war möglich, alle drei Zellpopulationen nachzuweisen und mit Hilfe des cLSM visuell darzustellen.

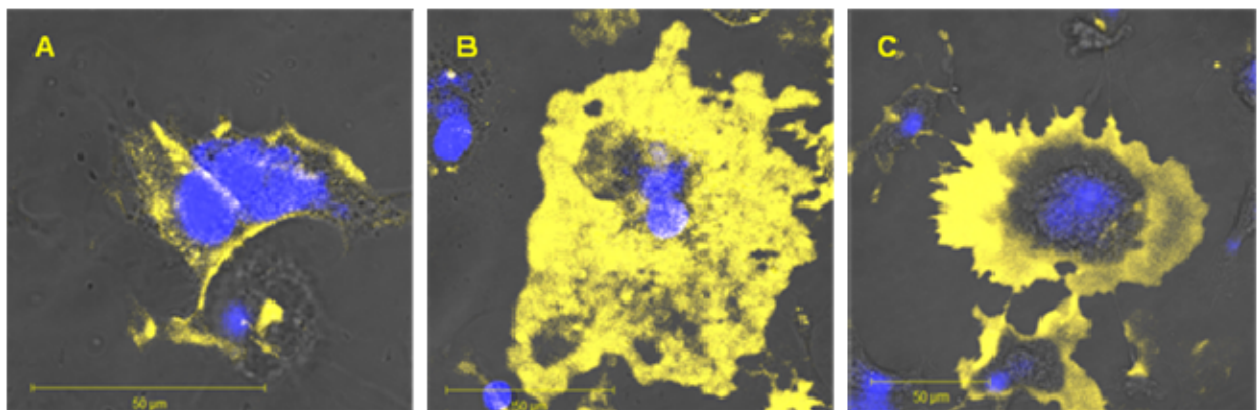


Abb. 6: Immunofluoreszenz potentiell immunkompetenter Zellen nach Oberflächenantigenen CD45 (A) , CD11b (B) , F4/80 (C)

Um die visuell nachgewiesenen Zellen der humoralen Immunantwort zu quantifizieren, wurden die Populationen mit Hilfe des FACS analysiert. Dabei zeigten sich innerhalb des *in vivo* Modells unterschiedliche Verteilungsraten für CD45-, CD11b- und F4/80- positive Zellen.

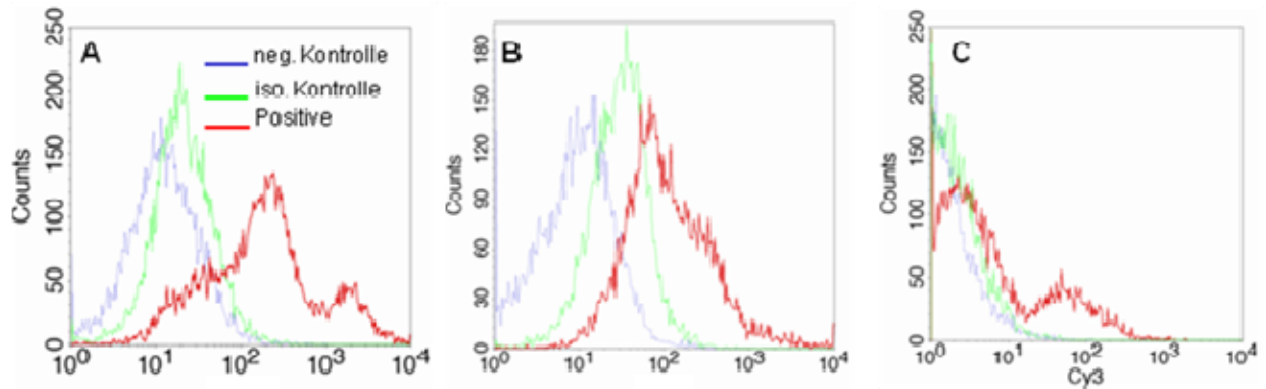


Abb. 7: Quantitative FACS-Analyse der sich nach 18 Tagen aus den EBs der Zelllinie CGR8 differenzierten potenziell immunkompetenten Zellen CD 45 (A), F4/80 (B), CD 11b (C), blau (Negativkontrolle), grün (Isotypen-Kontrolle), rot (Population, die für das AG positiv war)

Die prozentuale Verteilung der spontan in den EBs differenzierten Zellen ist in der Abb. Nr. 8 dargestellt. Der Anteil an $CD68^+$ - und $CD45^+$ -Zellen betrug ca. 35%, der Anteil an $CD11b^+$ -Zellen betrug ca. 20% und der Anteil an $F4/80^+$ -Zellen betrug ca. 25%.

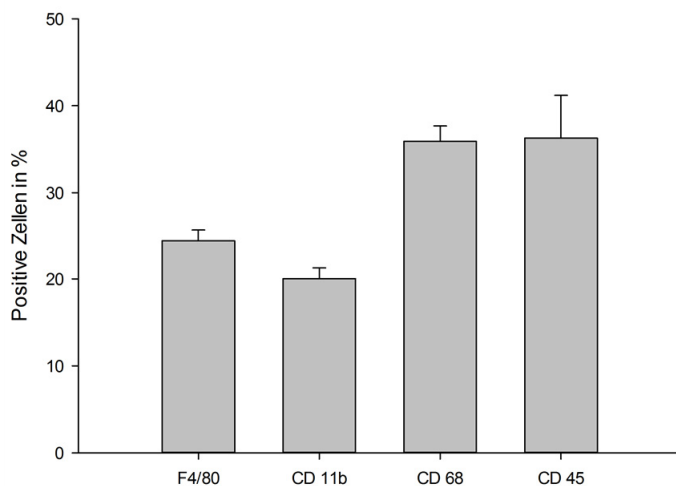


Abb. 8: Prozentuale Verteilung der immunkompetenten Zellen der EBs

5.2 Phagozytosefähigkeit der Makrophagen

Um nachzuweisen, dass 18 Tage alte murine differenzierte EBs der Zelllinie CGR8 zur Phagozytose fähig sind, wurden die EBs mit GFP-markierten *E. coli*-Bakterien für jeweils 2 h, 4 h, 6 h und 8 h koinkubiert. Die Fähigkeit der Zellen zur Aufnahme der GFP-markierten *E. coli* ist proportional zum detektierten GFP-Signal. Über die Zeit ließ sich eine Zunahme der GFP-positiv detektierten Zellen und damit der Phagozytosefähigkeit der EBs nachweisen. Zusammenfassend ließ sich ein signifikanter Anstieg der GFP-positiven EBs zwischen 2 bzw. 4 h und 8 h ko-Inkubation analysieren.

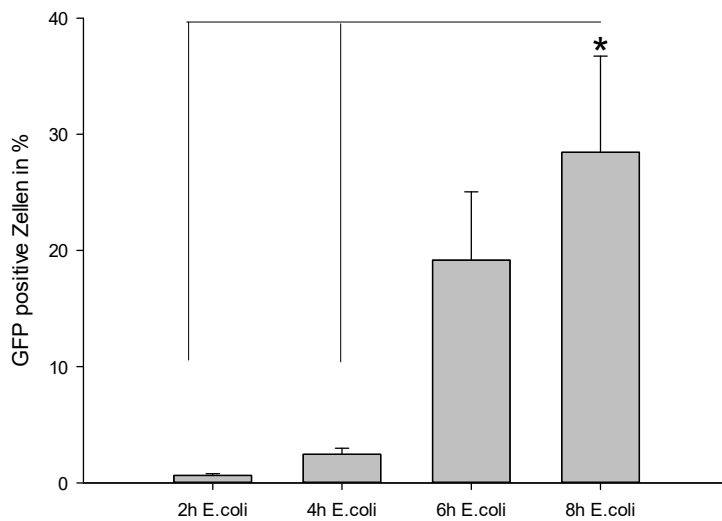


Abb. 9: Quantitative FACS-Analyse der GFP-positiven Zellen nach Ko-Inkubation von 18 Tage alten differenzierten Zellen der Zelllinie CGR8 mit GFP⁺ E. coli Bakterien, die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW \pm SEM gesetzt * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

5.3 Zellsorting nach Phagozytose von GFP- oder RFP-markierten E. coli

Es entstand die Idee, GFP- oder RFP-markierte E. coli als „Köder“ für die Makrophagen zu nutzen. Einerseits konnte man damit die Phagozytosefähigkeit der aus EB's spontan differenzierten Makrophagen darstellen und andererseits ergab sich daraus die Möglichkeit, die immunkompetenten phagozytosefähigen Zellen nach dem jeweiligen GFP- oder RFP-Signal zu sortieren.

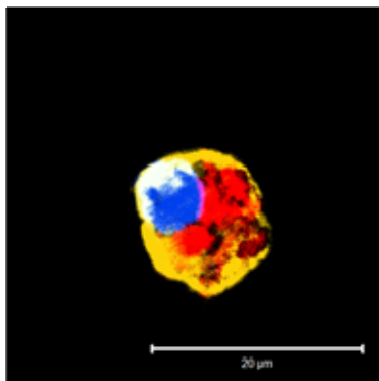


Abb. 10: F4/80 (gelb) positive Makrophage differenziert aus 18 Tage alten EBs der Zelllinie CGR8 mit intrazellulär darstellbaren RFP-markierten E. coli (rot)

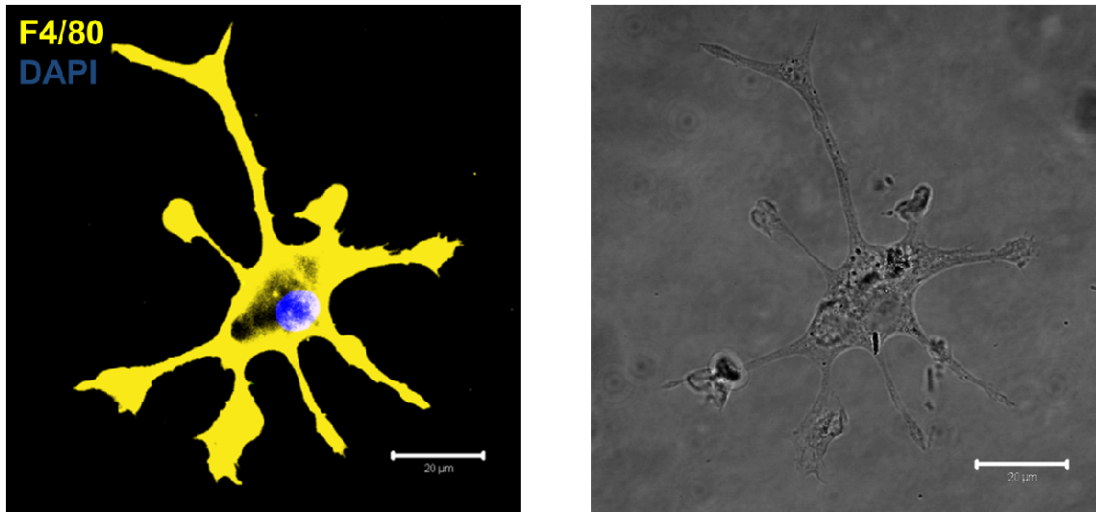


Abb. 11: Isolation von F4/80 positiven Zellen aus 18 Tage alten differenzierten EBs der Zelllinie CGR8 mittels Zellsorting nach Phagozytose von markierten E. coli

5.4 Hemmung der Phagozytose durch Cytochalasin

Um die Steuerbarkeit der EBs in Bezug auf Ihre Phagozytosefähigkeit zu untersuchen, wurden 18 Tage alte EBs in ihrer Phagozytose gehemmt. Es wurde das Spindelgift Cytochalasin D verwendet. 18 Tage alte EBs wurden 6 h mit E. coli und Cytochalasin D ko-inkubiert. Als Lösungsmittelkontrolle wurden parallel E.coli, 18 Tage alte EBs in DMSO ko-inkubiert. Auf Abb. Nr. 12 (A) ist sichtbar, dass die GFP-markierten E.coli Bakterien extrazellulär liegen, die CGR8 abgeleiteten 18 Tage differenzierten Stammzellen waren durch die Hemmung des Spindelapparates durch Cytochalasin D nicht in der Lage, die Bakterien nach intrazellulär aufzunehmen. Die Phagozytose konnte somit durch Inhibition der Aktin-Polymerisation durch Cytochalasin D *in vivo* gezeigt werden. Das Cytochalasin D wurde nach Herstellerangaben in DMSO gelöst. Um eventuelle Störungen der Phagozytose durch das Lösungsmittel auszuschließen wurde eine Kontrolle mitgeführt. Die 18 Tage alten CGR8 abgeleiteten differenzierten Stammzellen wurden 6 h mit DMSO und GFP-markierten E. coli ko-inkubiert. Auf Abb. Nr.12 (B) ist sichtbar, dass die Aufnahme der GFP-markierten Bakterien nach intrazellulär erfolgt ist. DMSO als Lösungsmittel zeigte somit keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose der EBs.

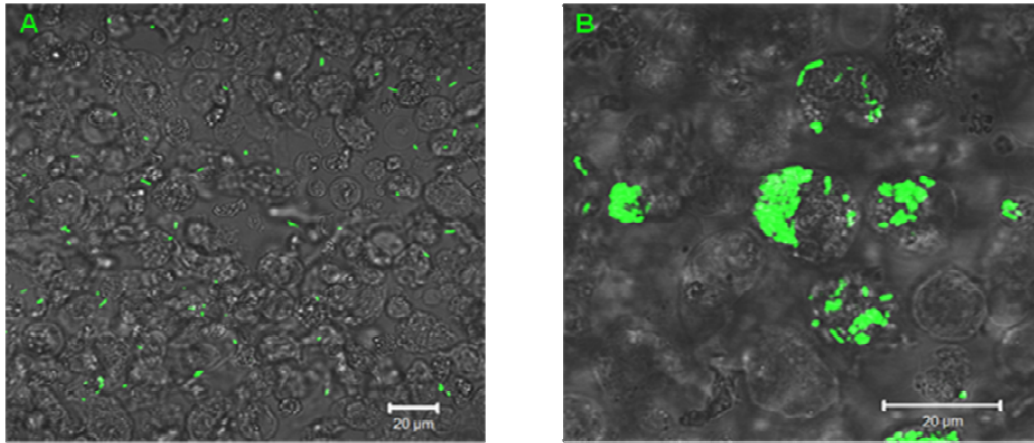


Abb. 12: 18 Tage alte CGR8 abgeleitete murine Stammzellen, 6 h Ko-Inkubiert mit GFP-markierten *E. coli* und Cytochalasin (A), als Lösungskontrolle (positiv Kontrolle) 6 h DMSO und GFP-markierte *E. coli* in Ko-Inkubation (B)

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde eine FACS-Analyse durchgeführt.

Diese zeigt in den Proben, in denen die Phagozytose durch Cytochalasin D gehemmt ist, nur eine Population Abb. Nr. 13 (A). In Proben, in denen die Phagozytose nicht gehemmt ist, sieht man noch eine zweite Population von Zellen Abb. Nr. 13 (B). Dieses sind die Zellen, die GFP markierte *E. coli* nach intrazellulär aufgenommen, also phagozytiert haben. Die statistische Auswertung der FACS-Analyse zeigt die prozentuale Verteilung der GFP-positiven Zellen zwischen 6 h Cytochalasin D und *E. coli* Ko-Inkubation und 6 h DMSO und *E. coli* Ko-Inkubation. Es ist ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Plots sichtbar. Die quantitative Auswertung ist in Abb. Nr. 14 sichtbar.

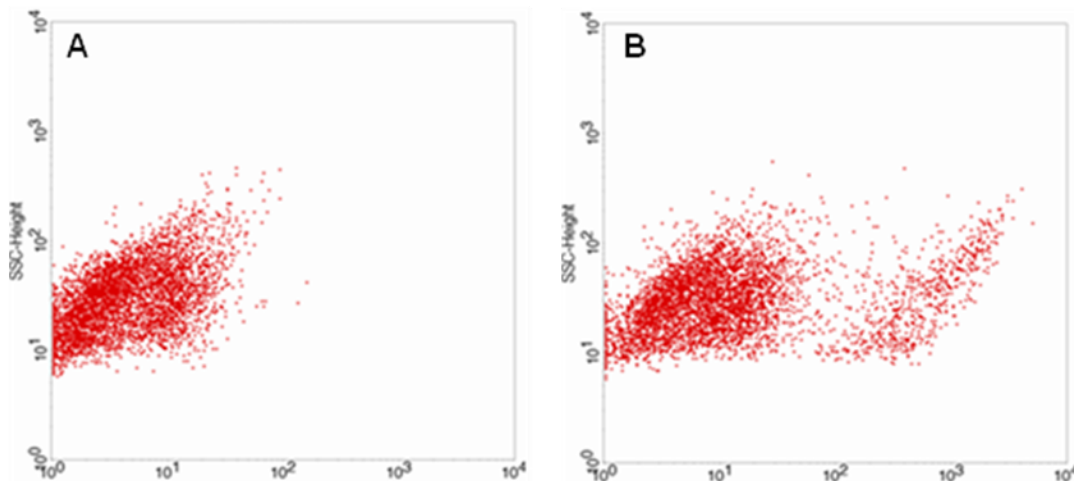


Abb. 13: Quantitative FACS Analyse des GFP- Signals an 18 Tage alten EBs der Zelllinie CGR8, 6 h GFP⁺-*E. coli* und Cytochalasin D (A), 6 h DMSO und GFP⁺-*E. coli* (B)

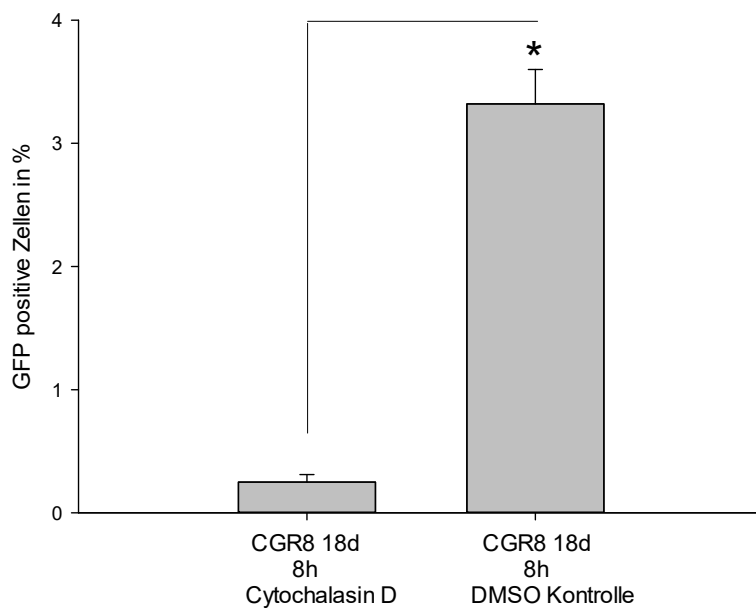


Abb. 14: Prozentuale Verteilung der GFP positiven Zellen mit und ohne Hemmung der Phagozytose durch den Aktin-Polymerasehemmer Cytochalasin D an 18 Tage alten EBs der Zelllinie CGR8, angegeben ist der MW \pm SEM und * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

5.5 Phagozytose von multiresistenten Keimen innerhalb des Modells

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die bisher analysierten immunkompetenten 18 Tage lang differenzierten EBs der Zelllinie CGR8 im *in vitro* Modell auch klinikkrelevante antibiotikaresistente Bakterien phagozytieren können. Dazu wurden E. coli-Bakterien mit einer ESBL-Resistenz verwendet. Die Inkubation der differenzierten Stammzellen mit den β -Lactam-resistenten E. coli erfolgte über 8 h. Es wurden 2 Kontrollen mitgeführt: ESBL E.coli und inaktivierte Fibroblasten (Fibroblastenkontrolle); und ESBL E. coli und Medium (Mediumkontrolle). Da die inaktivierten Fibroblasten nicht zur Phagozytose befähigt sind, konnte mit Hilfe der optischen Dichte des Mediums der Fibroblastenkontrolle in Bezug auf die Dichte des Mediums mit den phagozytotisch aktiven CGR8-abgeleiteten Stammzellen eine Aussage über die Phagozytoseleistung der 18 Tage alten EBs der Zelllinie CGR8 getroffen werden. Die Mediumkontrolle wurde mitgeführt um bakterizide Störfaktoren im Medium auszuschließen. Die statistische Auswertung zeigt eine signifikant geringere Dichte des Mediums der ESBL-E. coli-CGR8-Inkubation im Gegensatz zu dem Medium der Fibroblasten- und Mediumkontrolle.

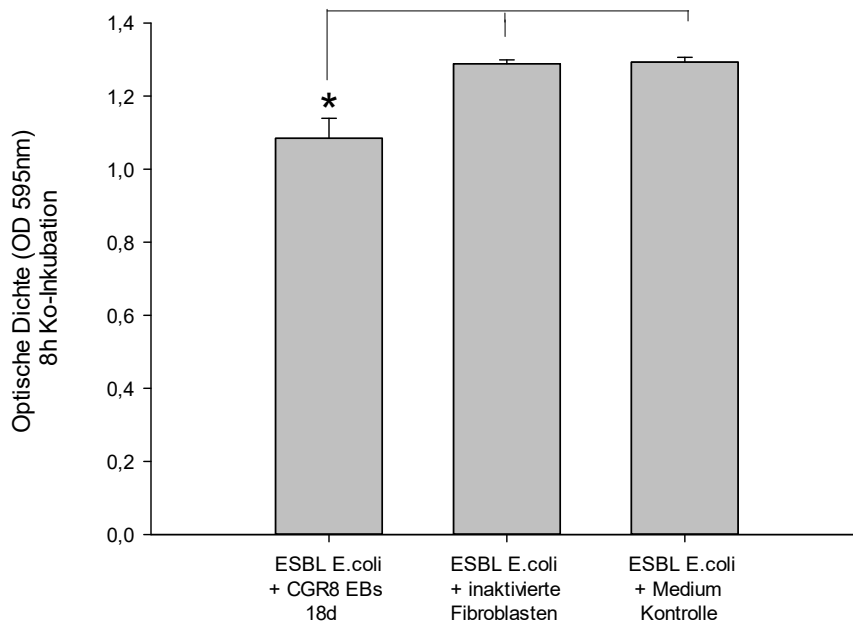


Abb. 15: Optische-Dichte-Messung der Medien nach 8 h Ko-Inkubation von 18 Tage alten EBs der Zelllinie CGR8 mit β -Lactam-resistenten E. coli, angegeben ist der MW \pm SEM und * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente n = 3

5.6 ROS bei der septischen myokardialen Dysfunktion

Die Differenzierung der CGR8-abgeleiteten murinen embryonalen Stammzellen führt nach ca. 8-10 Tagen Kultivierung zu typischen Kardiomyozyten, in welchen sich „sichtbar“ schlagende Areale nachweisen lassen. Dadurch wird es möglich, Untersuchungen hinsichtlich der Co-Existenz von Makrophagen und Monozyten durchzuführen.

5.6.1 Vitalitätsmessung der zu Kardiomyozyten differenzierten Stammzellen unter inflammatorischen Bedingungen

Die EBs wurden über 24 h mit E. coli-Bakterien ko-inkubiert und die schlagenden Areale zu definierten Zeitpunkten gezählt. Mit den Kontrollen ohne E. coli-Inkubation wurde gleichermaßen verfahren. In der Abb. Nr. 16 sind die schlagenden Areale in Prozent aufgetragen. Zwischen dem Start des Versuchs zum Zeitpunkt 0h und im weiteren Verlauf zu den Zeitpunkten 4h und 6h sieht man zunächst keinen signifikanten Unterschied zwischen E.coli-inkubierten schlagenden Arealen und den schlagenden Arealen der Kontrollen. Ab 10 h Inkubationsdauer nimmt der Anteil der schlagenden Areale bei der E. coli Ko-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab. Zum Zeitpunkt 24 h war die E.coli Inkubation für die EBs letal. Lichtmikroskopisch waren keine schlagenden Areale mehr sichtbar. Deshalb

kommt es hier zu einem signifikanten Unterschied zwischen der 24 h-Kontrolle und der 24 h E. coli-Inkubation.

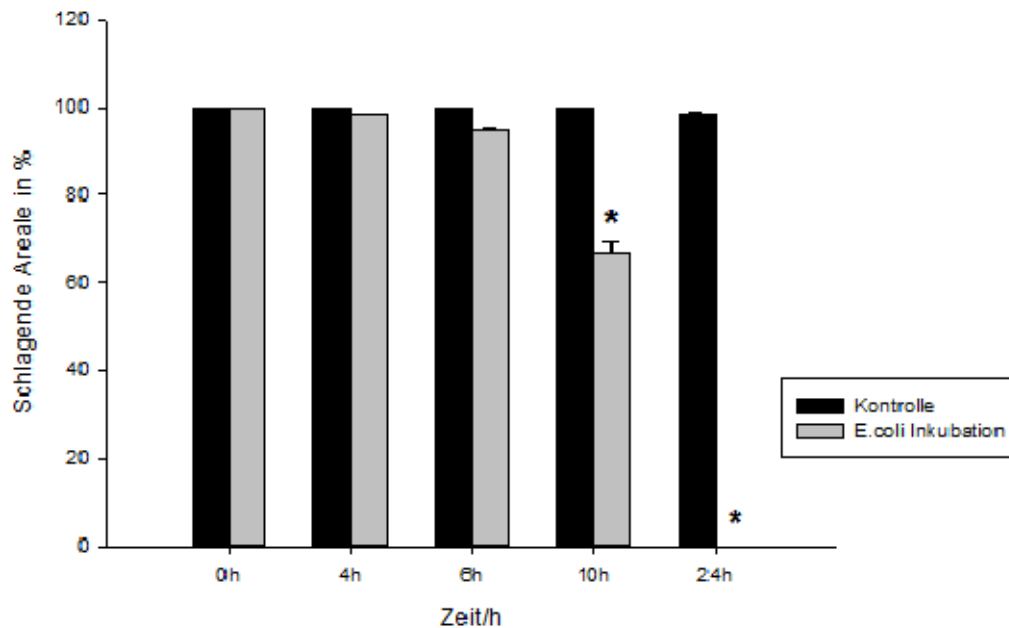


Abb. 16: Zählung der schlagenden Areale an 18 Tage alten CGR8 EBs über die Zeit nach initialer E. coli- Inkubation mit äquivalenter Infektionsdosis, angegeben ist der MW \pm SEM und * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

Um potentielle Ursachen für die myokardiale Schädigung während der septischen myokardialen Dysfunktion aufzuzeigen, wurde die Generierung von ROS durch die EBs im Anschluss an die Vitalitätsmessung im Sinne des *in vivo/in vitro*-Vergleichs untersucht.

5.6.2 Bildung von ROS durch EBs

Die ROS-Bildung wurde an schlagenden Arealen der Stammzelllinie CGR8 an Tag 18 gemessen. Die EBs wurden hierzu mit Serum von Mäusen mit induzierter, letaler Sepsis (mittels PCI) stimuliert und die Fluoreszenz im Zeitintervall 0 min, 5 min, 10 min, 15 min und 20 min gemessen. Als Kontrolle diente Serum der entsprechenden Sham-Mäuse (6h NaCL).

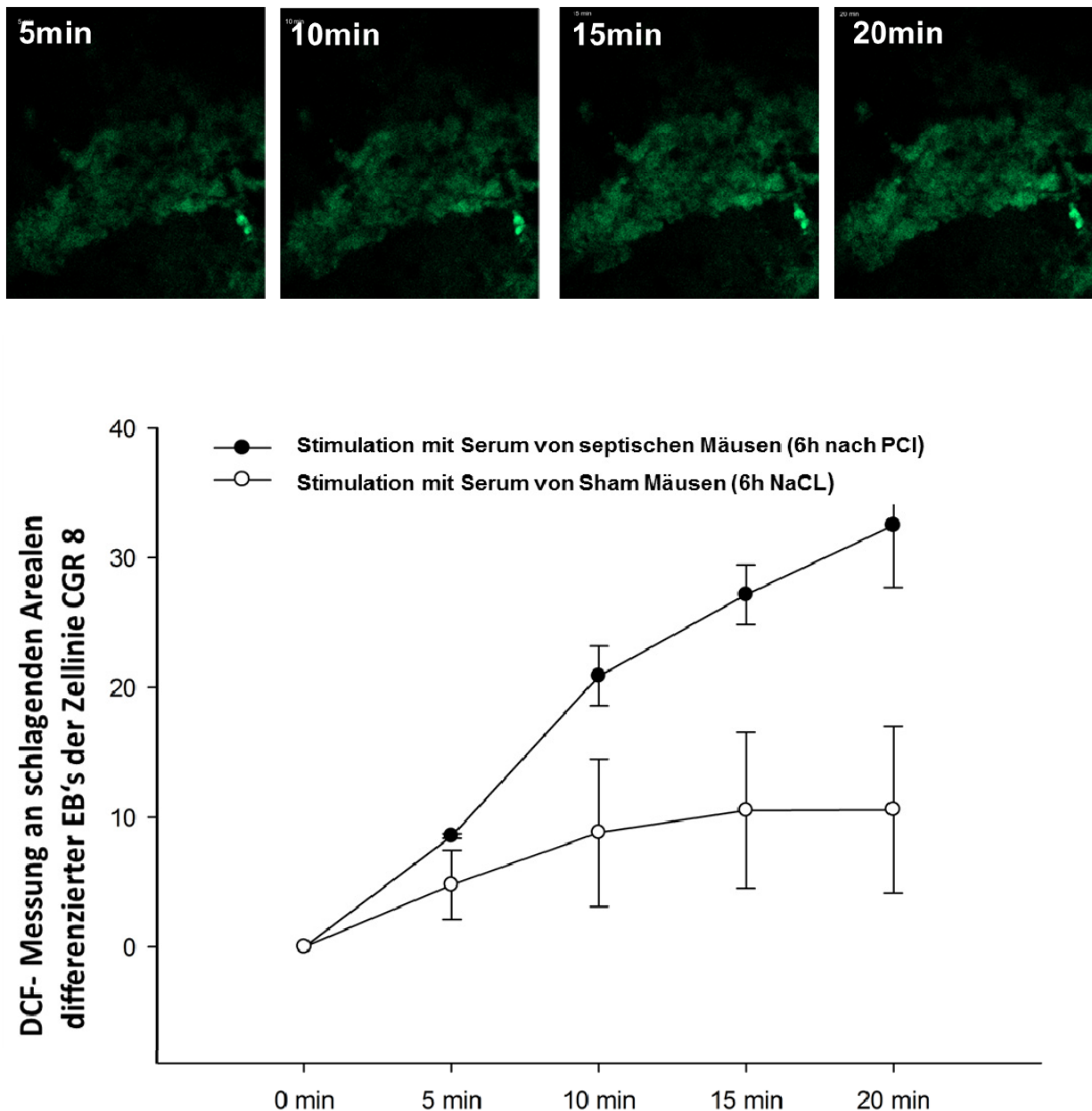


Abb. 17: Visuelle und graphische Darstellung der ROS- Produktion mittels DCF- Fluoreszenzmessung an schlagenden Arealen der Zelllinie CGR8 Koinkubation von 18 Tage alten kultivierten EBs mit Serum von Mäusen mit induzierter Sepsis (6h PCI) im Vergleich zu Sham-Mäuse (6h NaCl), angegeben ist der MW \pm SEM und * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

Die ROS-Produktion steigt bei den EBs ko-inkubiert mit dem Serum von Mäusen mit induzierter Sepsis über die Zeit kontinuierlich an und erreicht nach 20 min ein Maximum. Bei der Kontrollinkubation von EBs mit Serum von Sham-Mäusen (6h NaCl) steigt die ROS-Produktion zunächst leicht an und bleibt dann bei 15 min und 20 min konstant.

Zusammenfassend zeigt sich nach 20 min ein signifikanter Unterschied in der Betrachtung beider Gruppen.

5.7 Bildung von ROS am Herzgewebe der Maus

Um die *in vitro* erworbenen Erkenntnisse bezüglich der ROS am *In vivo*-Modell abzugleichen, wurde ein nährungsweiser enzymatischer Nachweis von H_2O_2 mit Hilfe von 3',3'-Diaminobenzidinetetrahydrochlorid (DAB) an kryostatischen Schnitten des Herzens durchgeführt. Bei Abb. Nr. 18 (A) handelt es sich um einen kryostatisch hergestellten Schnitt eines Herzens einer Maus 6 h nach Sepsisinduktion mittels PCI. Man sieht einen deutlichen braunen Niederschlag von Manganoxidhydroxid (braun), dem Endprodukt der enzymatischen Reaktion von H_2O_2 mit Chromagan. Im Vergleich dazu sieht man in Abb. Nr. 18 (B) einen Kryoschnitt eines SHAM-Herzens 6h nach intraperitonealer NaCl-Injekton. Hier ist eine deutlich geringere braune Färbung sichtbar.

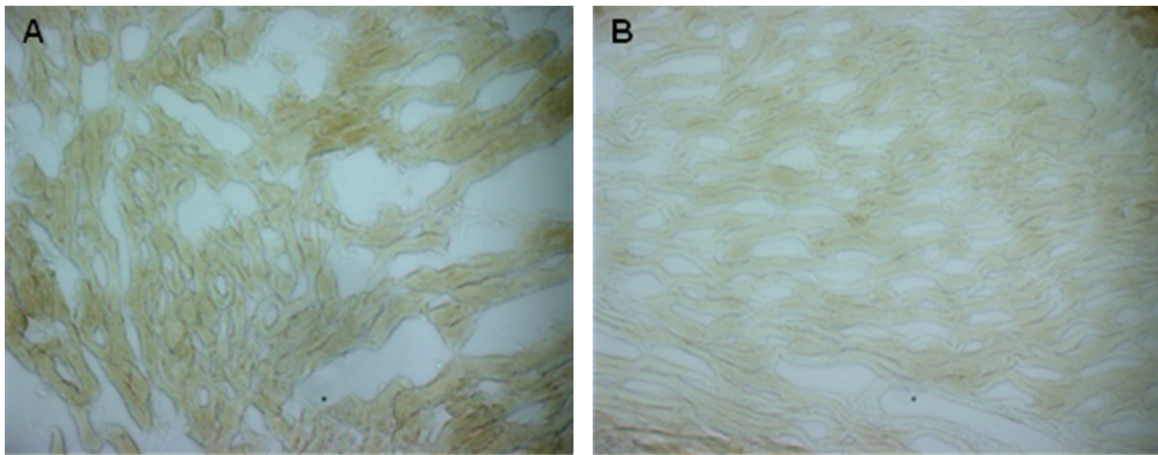


Abb. 18: Kryostatisch Hergestellte Schnitte nach 10 min DAB Exposition, Sepsis 6 h PCI (A), Sham 6 h nach intraperitonealer NaCl-Injektion (B)

Zur Auswertung der DAB-Färbung an den Herzschnitten wurde in Abb. Nr. 19 ein semiquantitativer Bildvergleich durchgeführt. Anhand des Bildvergleiches mit negativen, einfach positiven und zweifach positiven Optionen der subjektiven Beurteilung wurden alle Bilder der Kontroll-, SHAM- und Sepsis-Gruppe verglichen. Bei den Kontrollen ohne Interaktion sind 80 % der Bilder negativ. Bei den SHAM 6 h nach intraperitonealer NaCl-Injektion sind 60 % einfach positiv und 40 % negativ. Bei den Sepsis-Bildern sind 25 % der Bilder einfach und 65 % zweifach-positiv. Es ist damit eine Tendenz zur erhöhten ROS-Produktion bei Sepsis Induktion zu erkennen.

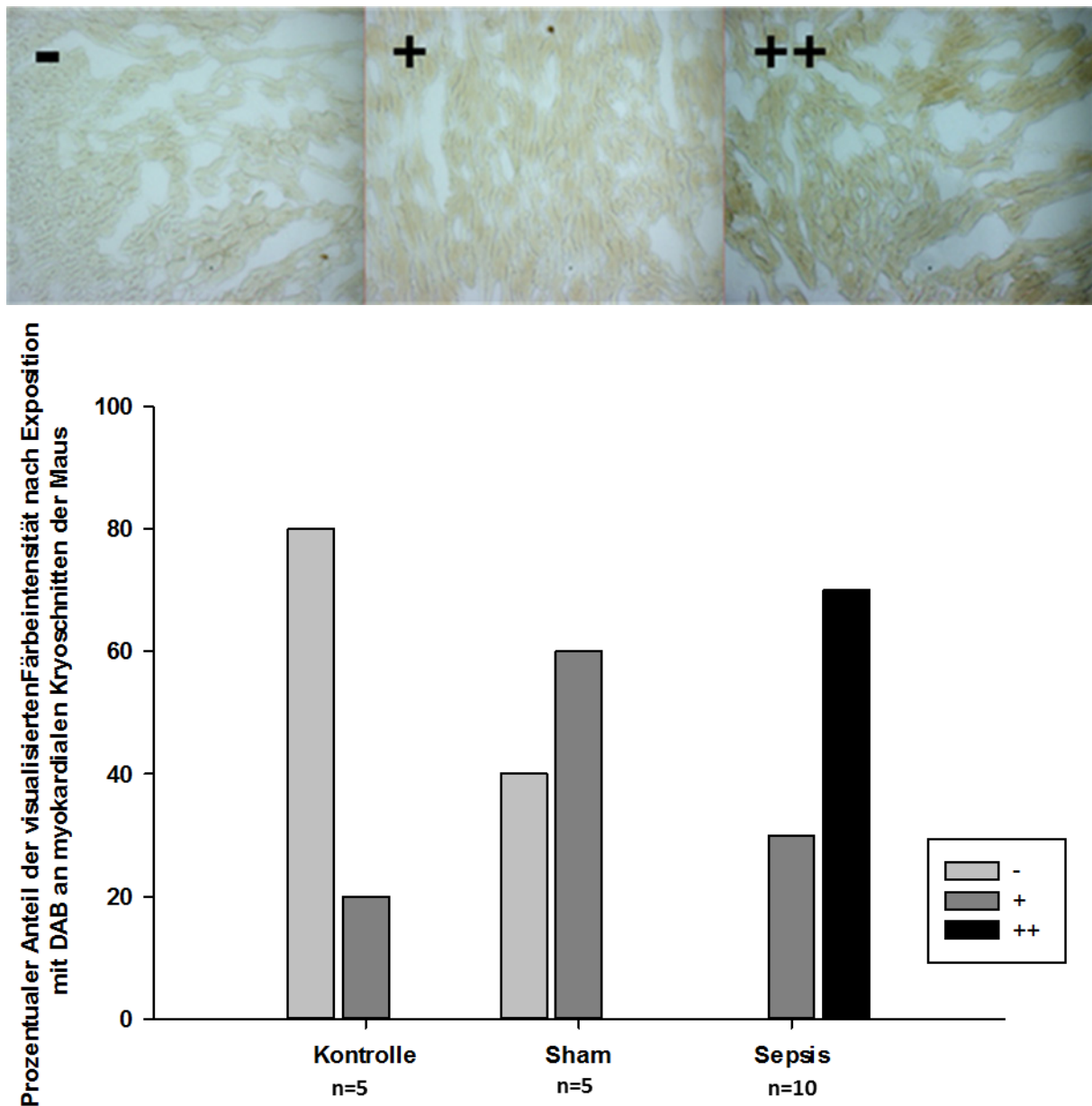


Abb. 19: Prozentuale Auswertung des Bildvergleichs von kryostatistischen Herzschnitten nach 10 minütiger 3',3' Diaminobenzidinetetrahydrochlorid (DAB)-Exposition, 6h nach intraperitonealer NaCL-Injektion (SHAM), 6h nach intraperitonealer PCI (Sepsis), sowie ohne Interaktion (Kontrollen)

5.7.1 Residente myokardiale Makrophagen als mögliche ROS-Produzenten

Um eine Aussage darüber zu treffen, ob residente myokardiale Makrophagen als mögliche ROS- und ggf. als NOX2-Quelle infrage kommen, wurde die mRNA-Expression von Makrophagen im kardialen Gewebe von Mäusen untersucht. Es wurde die Expression der F4/80-, CD11b- und CD68-Gene mittels RTD-PCR untersucht. Die Daten jedes dieser Gene wurde zur Vergleichbarkeit gegen die Daten des *housekeeping*-Genes Polymerase 2 α normalisiert.

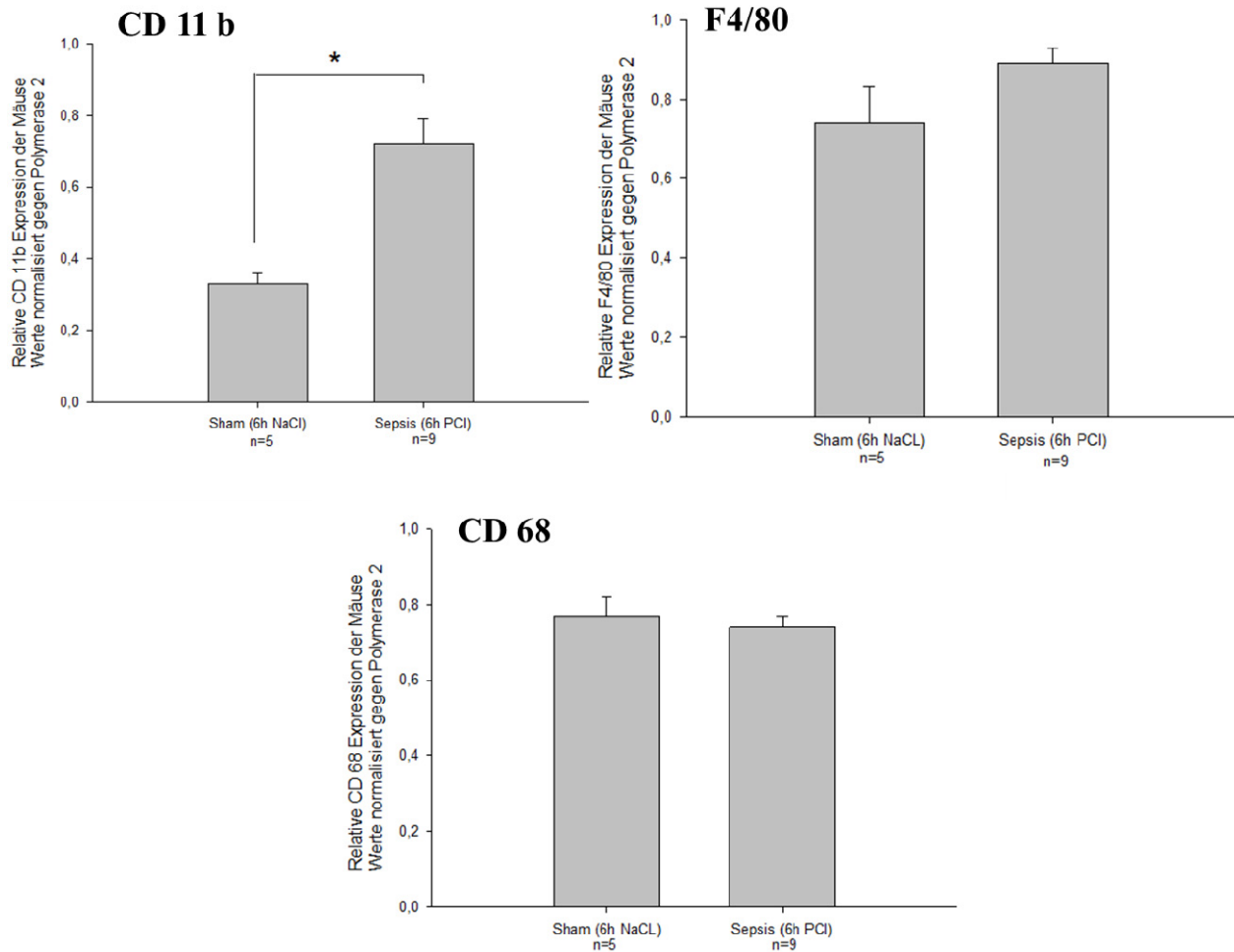


Abb. 20: Relative mRNA-Expression der Gene CD11b, F4/80 und CD68 analysiert an Proben von Herzgewebe von Mäusen, Sham (6h NaCL) und Sepsis (6h nach PCI), die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW \pm SEM der zugehörigen Kontrolle (Sham) gesetzt * = p <0,05

Die mRNA- Expression des Herzgewebes von Mäusen für CD11b beträgt im Vergleich zur Kontrolle (Sham) bei der Sepsis das ca. 2,5-Fache und ist damit signifikant erhöht. Die mRNA-Expression von F4/80 zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine leichte Erhöhung, allerdings keinen signifikanten Unterschied. Die CD68 mRNA-Expression zeigt bei Sepsis im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied.

5.8 NOX2 als Hauptquelle der ROS-Produktion

Bei der humoralen Abwehr durch die Generierung von ROS spielen viele Isotypen der NOX eine Rolle. Im Folgenden wurde die NOX2-Generierung quantitativ mit Hilfe der RTD-PCR und des Westernblots im *in vivo/in vitro*- Vergleich untersucht. Die NOX2 spielt eine wesentliche Rolle bei Abwehrmechanismen durch inflammatorische Stimuli ausgelöst durch Neutrophile Granulozyten und Makrophagen.

5.8.1 NOX2 am Herzgewebe der Maus

Der Nachweis der NOX2-mRNA-Expression erfolgte durch RTD-PCR. Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten gegen die Daten des *housekeeping*-Genes Polymerase 2a normalisiert. Es konnte eine gesteigerte Expression des NOX2-Gens bei dem Gewebe der Maus mit induzierter Sepsis (6h PCI) im Vergleich zu der Sham-(6h NaCL)-Kontrollmaus gezeigt werden. Es ist ein ca 2,5-fach erhöhter und damit signifikanter Unterschied bei den Mäusen mit induzierter Sepsis im Vergleich zu den Shammäusen darstellbar. Parallel konnte die NOX2 an Paraffinschnitten des Herzmuskels dargestellt werden.

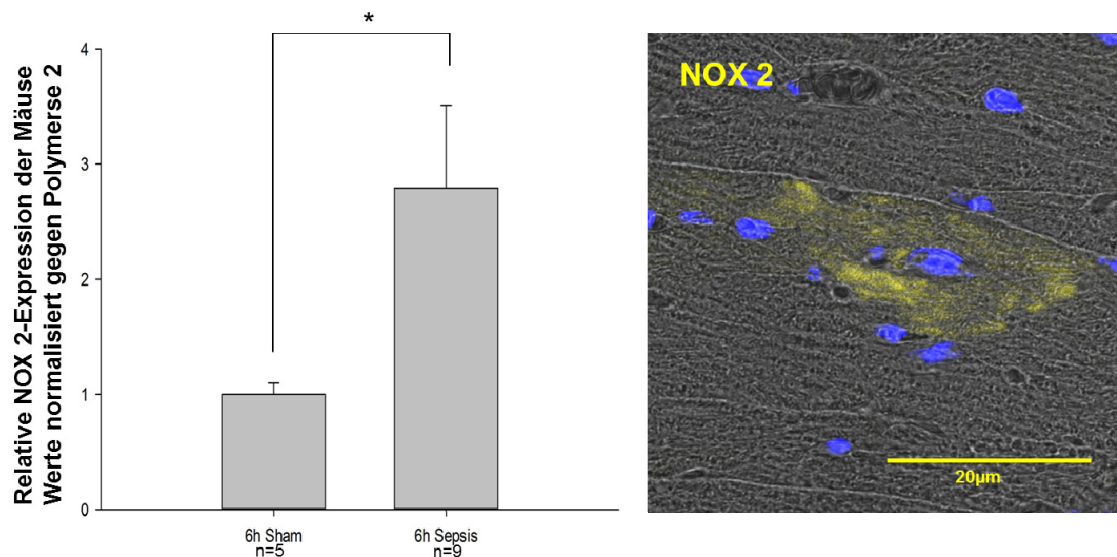


Abb. 21: Relative NOX 2-Expression nach Sepsisinduktion am Herzgewebe der Maus, die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW±SEM der zugehörigen Kontrolle (Sham) gesetzt * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

5.8.2 NOX2 Produktion der EBs

Um eine Aussage bezüglich des *in vivo/in vitro*- Vergleichs treffen zu können, wurde ein Westernblot nach inflammatorischem Reiz an EBs durchgeführt um die Rolle der NOX2 auch *in vitro* zu quantifizieren. Zur Vergleichbarkeit wurden die Daten gegen das *housekeeping*-Protein GAPDH normalisiert. Die differenzierten EBs wurden 6 h und 10 h mit *E. coli* koinkubiert. Als Kontrolle wurden EBs genutzt, die keiner *E. coli* Inkubation ausgesetzt waren. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der NOX2-Proteinexpression bei 6 h ausgeprägter als bei 10 h im Vergleich zur Kontrolle bei 0 h.

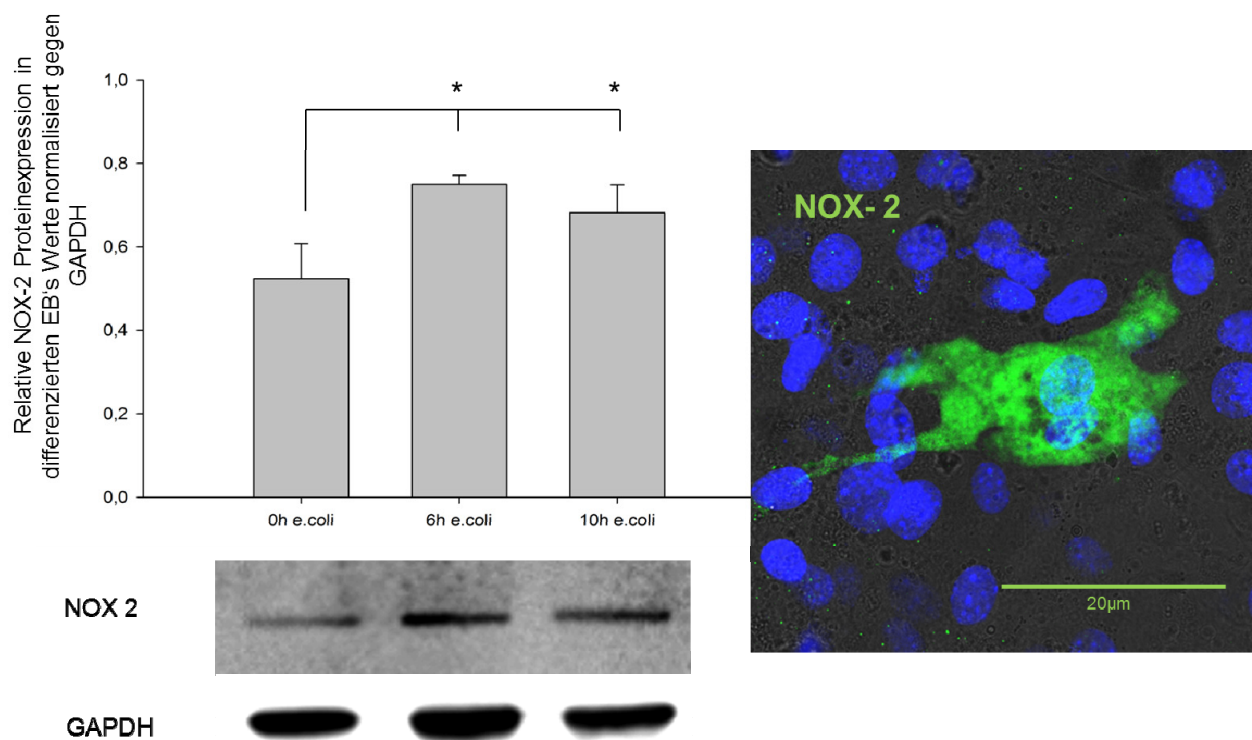


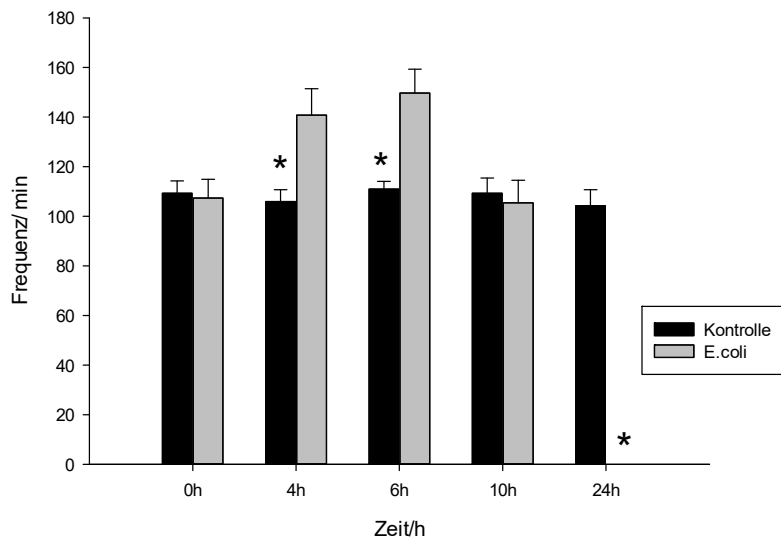
Abb. 22: Relative NOX 2-Protein-Expression an differenzierten EBs (Tag 18) der Zelllinie CGR8 nach Sepsisinduktion, die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten $MW \pm SEM$ der zugehörigen Kontrolle (0 h *E. coli*) gesetzt $* = p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

5.9 Untersuchungen der Reaktionsfähigkeit der EBs nach inflammatorischem Reiz

Zu den klinischen Diagnosekriterien einer Sepsis zählt u. a. die Tachykardie mit > 90 Schlägen/min, d.h. physiologischerweise reagiert der Körper *in vivo* auf eine starke Inflammation mit einem Anstieg der Herzfrequenz. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die EBs nach inflammatorischen Stimulus ebenfalls in der Lage sind, mit Steigerung der Schlagfrequenz zu reagieren, wurden die Frequenzen an schlagenden Arealen über die Zeit gezählt.

5.9.1 Frequenzzählung

Um die Reaktion der EBs auf die inflammatorischen Bedingungen zu untersuchen, wurden zu definierten Zeitpunkten über 24 h die Schlagfrequenzen pro Minute gezählt. Zum Startzeitpunkt 0 h liegt die Frequenz bei Kontrolle und E. coli um die 105/min. Die Frequenzen steigen zu den Zeitpunkten 4 h und 6 h signifikant auf 140/min bzw. 150/min zur Kontrolle an. Nach 10 h sinken die Frequenzen auf das Niveau des Ausgangszustands. 24 h nach PCI sieht man ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und E. coli-inkubierten EBs. Dieser Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass 24 h nach PCI keine schlagenden Areale mehr sichtbar waren.



**Abb.23: Schlagfrequenz differenzierter 18 Tage alter EBs nach initialer E. coli-Inkubation, die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW \pm SEM der zugehörigen Kontrolle gesetzt
* = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 4$**

5.9.2 Bestimmung des kardialen Troponins I (cTnI)

Das cTnI als Teil des kontraktilen Apparates der Kardiomyocyten wurde als Parameter bestimmt, um die myokardiale Schädigung im Rahmen der „septischen“ Kardiomyopathie zu untersuchen. In Abb. Nr. 24 ist die Troponinkonzentration in pg/ml der Seren der Mäuse aufgetragen. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Sepsis induzierten Mäusen und den Sham-Mäusen gezeigt werden. In der *in vitro*- Messung der Überstände der EBs in Abb. Nr. 25 wurde die Troponinkonzentration nach initialer E. coli-Inkubation gegen die Negativkontrolle zu zwei definierten Zeitpunkten bestimmt. Man sieht einen konstanten

Anstieg der Troponinkonzentration der E. coli inkubierten EBs. Es konnte zu beiden Zeitpunkten ein signifikanter Anstieg des Troponins im Vergleich zur Negativkontrolle gezeigt werden.

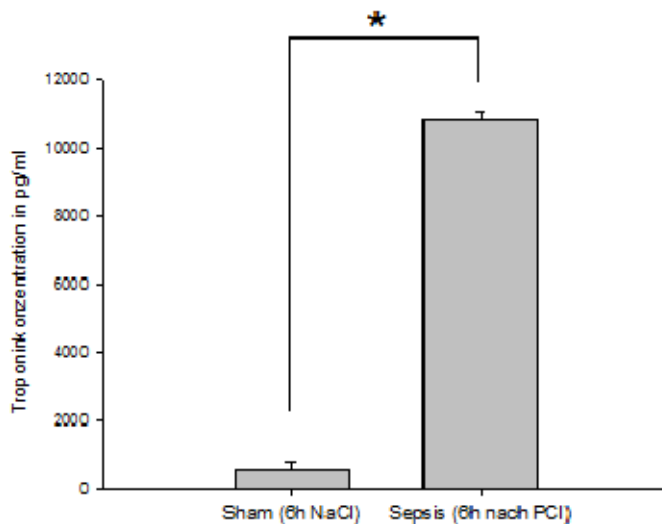


Abb. 24: Kardiale Troponin-I-Konzentration der Mäuse , 6 h nach intraperitonealer NaCL Injektion (SHAM) und 6h nach PCI (Sepsis), die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW±SEM der Kontrolle (Sham) gesetzt * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 5$

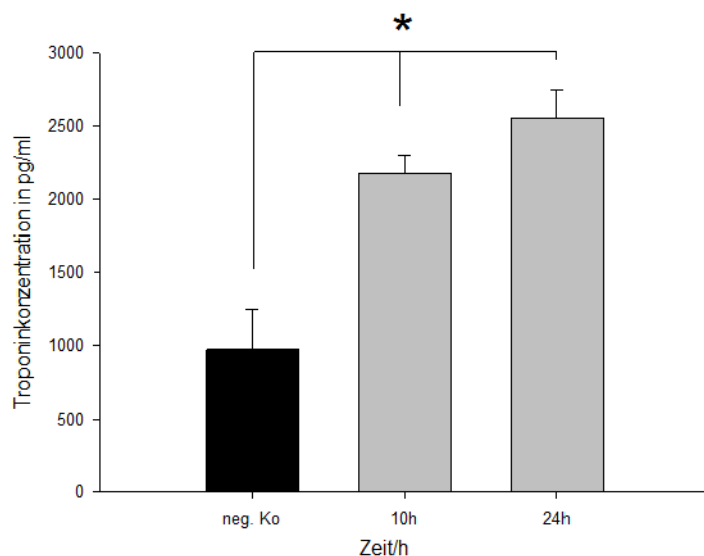
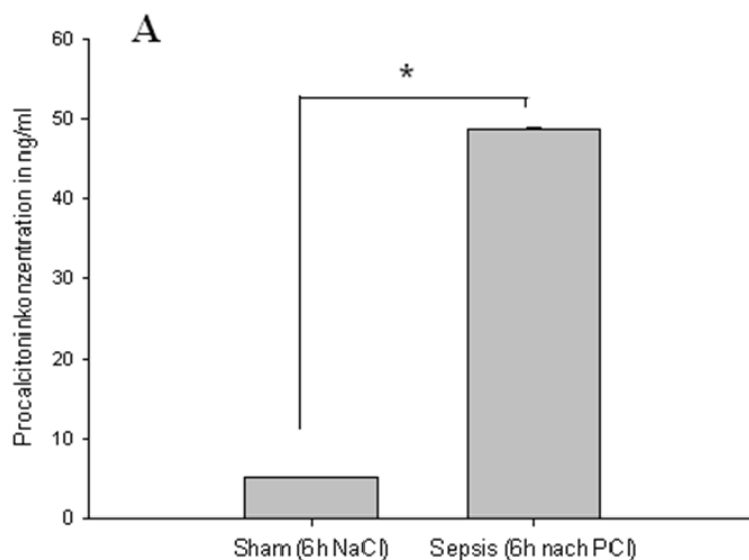


Abb. 25: Kardiale Troponin-I-Konzentration bestimmt in Überständen agbenommen von 18 Tage alten EBs der Zelllinie CGR8 nach initialer E. coli Inkubation über die Zeit, die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW±SEM der Kontrolle gesetzt * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

5.9.3 Bestimmung des Sepsismarkers Procalcitonin (PCT)

Die Bestimmung des Procalcitonins als einer der sensitivsten klinischen Sepsismarker wurde auch im *in vivo/in vitro* Vergleich bei den Mäusen und den EBs durchgeführt. In Abb. Nr. 26 (A) sieht man die Procalcitoninkonzentration in den Seren von Mäusen mit induzierter Sepsis im Vergleich zu den Sham-Mäusen. Sham-Mäuse (6h nach intraperitonealer NaCl- Injektion) haben einen Wert von ca. < 10 ng/ml im Vergleich zu den Mäusen mit induzierter Sepsis (6h nach PCI) mit Werten von ca. 50 ng/ml. Es ist ein deutlich signifikanter Unterschied nachzuweisen. In Abb. Nr. 26 (B) sieht man die Procalcitoninkonzentration in den Überständen der EBs zu definierten Zeitpunkten nach initialer *E. coli*-Inkubation. Die Kontrollen bleiben über 24 h konstant bei Werten von ca. < 5ng/ml. Bei den *E. coli*-inkubierten EBs sieht man einen immensen Anstieg ab 4 h auf Werte von bis zu 19 ng/ml, die sich dann auch über 6 h, 10 h und 24 h auf diesem Level halten. Das PCT wird physiologischerweise von den C-Zellen der Schilddrüse und bei starkem inflammatorischem Geschehen von der Leber gebildet. Dieses impliziert, dass sich bei der 18 Tage andauernden Differenzierung der EBs der Zelllinie CGR8 auch solche Gewebetypen ausdifferenzieren, sonst wäre der Nachweis von PCT in den gewonnen Überständen der EBs nicht möglich.



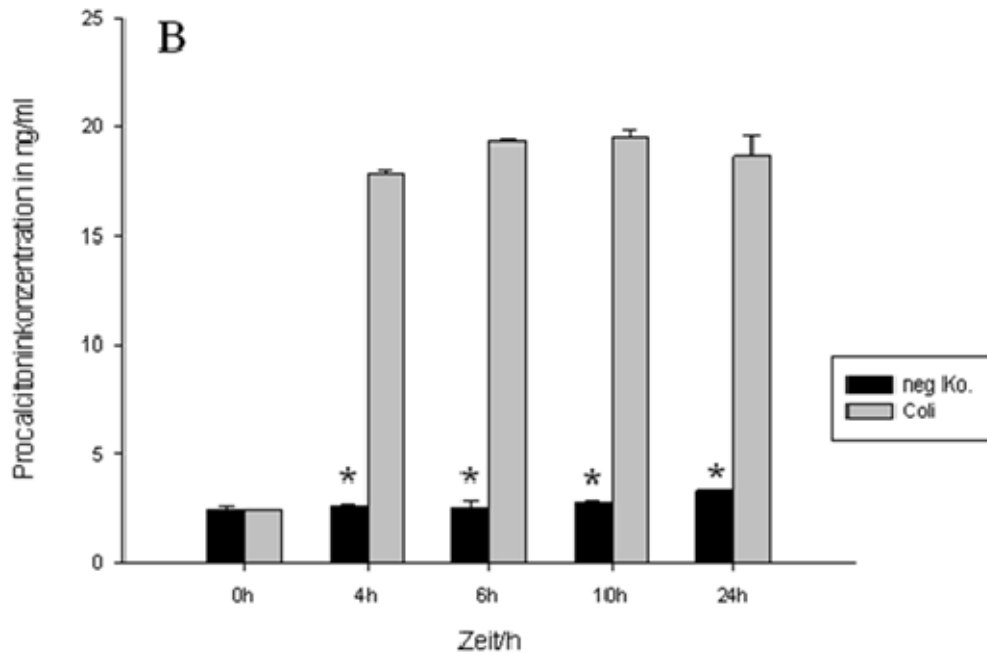


Abb.26: Procalcitoninkonzentration der Mäuse, 6 h nach NaCl intraperitonealer Injektion (Sham) und 6h nach PCI (Sepsis) (A) Anzahl der Experimente n = 5, Procalcitoninkonzentration in den Überständen der EBs nach initialer E. coli-Inkubation über 24 h (B) Anzahl der Experimente n=3, die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW±SEM der zugehörigen Kontrolle gesetzt * = $p < 0,05$

5.9.4 Inflammation

5.9.4.1 Interferon- γ (INF- γ)

Die Aktivierung der Makrophagen erfolgt über das INF- γ . In Abb. Nr. 27 ist die INF- γ Konzentration zwischen Sham-Maus und den mit Sepsis induzierten Mäusen dargestellt. Die Grafik zeigt, dass sich die INF- γ -Konzentration 6 h nach Sepsisinduktion signifikant erhöht.

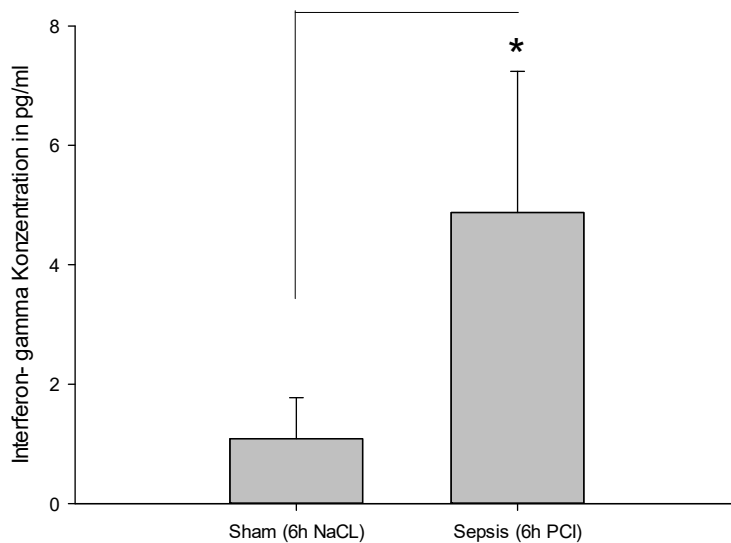


Abb. 27: Interferon- γ -Konzentration in den Seren der Mäuse, die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW \pm SEM der Kontrolle (Sham) gesetzt * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

5.9.4.2 Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF- α)

TNF- α ist ein Akute-Phase-Protein und stimuliert die Phagozytose der Makrophagen und wurde deshalb bestimmt. In Abb. Nr. 28 (A) ist die TNF- α -Konzentration der Mausseren dargestellt. Man sieht eine signifikante Erhöhung nach Sepsis-Induktion im Vergleich zur Kontrolle (Sham). Die Überstände der EBs nach E.coli Inkubation über die Zeit im Vergleich zur Negativkontrolle sind in Abb Nr. 28 (B) dargestellt. Die TNF- α -Konzentration steigt kontinuierlich an und ist nach 6 h und 10 h im Vergleich zur Kontrolle signifikant.

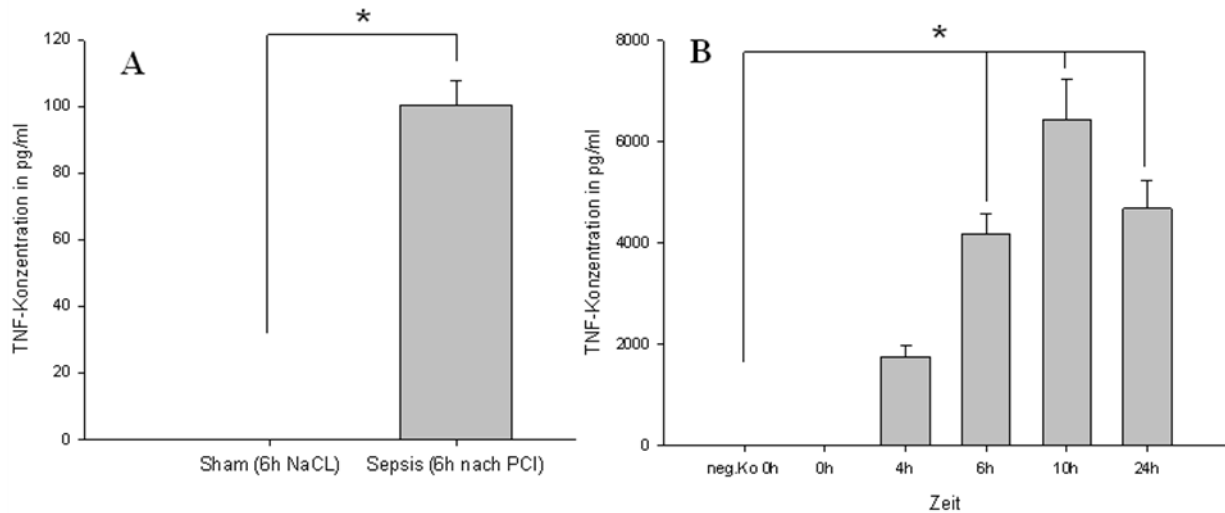


Abb.28: TNF- α Konzentration in den Seren der Mäuse (A) sowie in den Überständen der EBs an Tag 18 abgenommen nach Ko-Inkubation mit *E. coli* (B), die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW \pm SEM der zugehörigen Kontrolle gesetzt * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

5.9.4.3 Interleukin-6 (IL-6)

Die systemische Wirkung bei einer schweren Infektion wird durch IL-6 vermittelt, das *in vivo* in der Leber synthetisiert wird. In Abb. Nr. 29 (A) ist der signifikante IL-6 Anstieg im Serum der Maus mit induzierter Sepsis im Vergleich zur Sham-Maus dargestellt. In Abb. Nr. 29 (B) ist ein kontinuierlicher Anstieg der IL-6-Konzentration in den Überständen der EBs darstellbar. Signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle konnten nach 6 h, 10 h und 24 h gezeigt werden. Auch bei diesem Ergebnis ist davon auszugehen, dass 18 Tage differenzierte EBs der Zelllinie CGR8 auch Gewebetypen differenzieren, die zur IL-6-Produktion fähig sind.

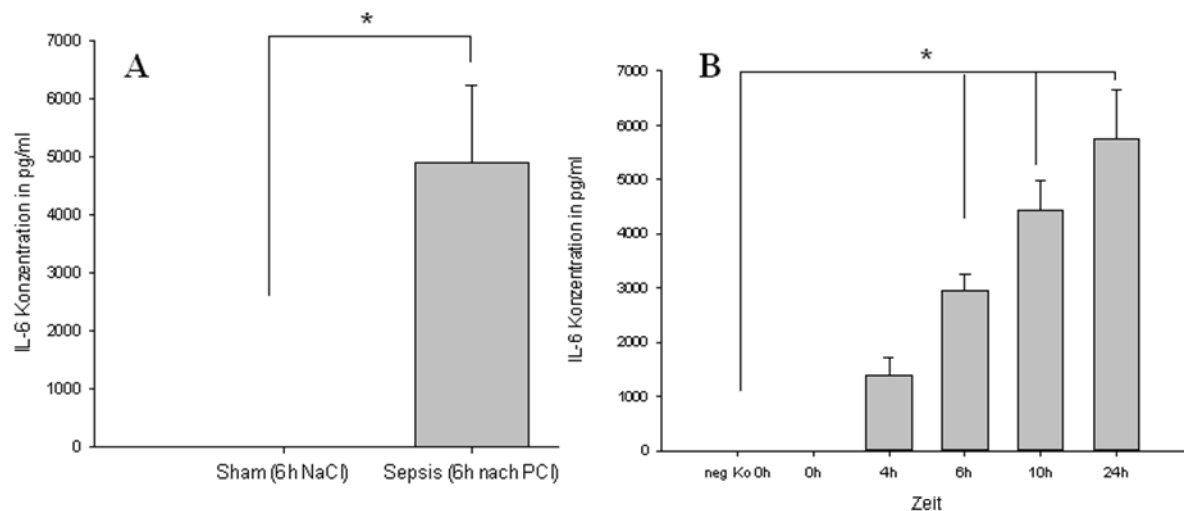


Abb. 29: IL-6-Konzentration in den Seren der Mäuse (A) sowie in den Überständen der EBs an Tag 18 abgenommen nach Ko-Inkubation mit E. coli (B), die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW \pm SEM der zugehörigen Kontrolle gesetzt * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

5.9.4.4 Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)

MCP-1 ist ein Chemokin und vermittelt die Chemotaxis. Die MCP-1-Konzentration in den Seren der Mäuse ist in Abb. Nr. 30 (A) dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Mäusen mit induzierter Sepsis und den Sham-Mäusen in Bezug auf ihre MCP-1 Konzentration. Die Überstände der EBs nach inflammatorischer Induktion in Abb. Nr. 30 (B) zeigen nach 4 h einen signifikanten Anstieg der MCP-1 Konzentration. Danach fällt die MCP-1-Konzentration zu den Zeitpunkten 6 h, 10 h und 24 h signifikant zur Kontrolle ab.

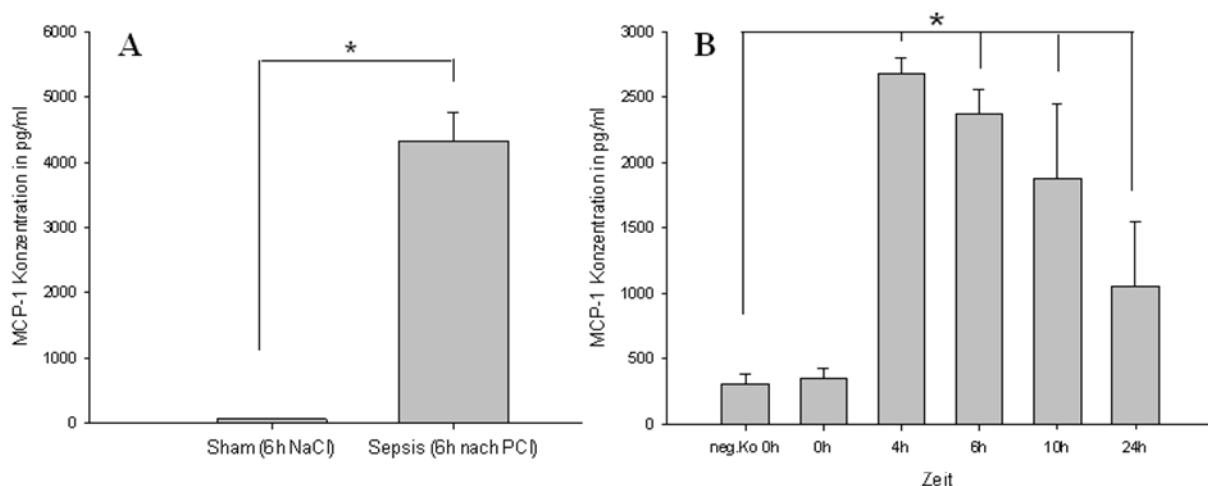


Abb. 30: MCP-1-Konzentration in den Seren der Mäuse (A) sowie in den Überständen der EBs an Tag 18 abgenommen nach Ko-Inkubation mit E. coli (B), die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW \pm SEM der zugehörigen Kontrolle gesetzt * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

5.9.4.5 Interleukin-10 (IL-10)

Für das anti- inflammatorische IL-10 konnte in Abb Nr. 31 (A) in den Seren der Mäuse eine signifikante Konzentrationserhöhung zwischen Sham-Maus und mit Sepsis induzierter Maus gezeigt werden. Die in Abb. Nr. 31 (B) dargestellten IL-10 Konzentrationen für die Überstände der EBs nach inflammatorischer Induktion zeigen, dass die IL-10-Konzentration im Zeitraum von 0 h bis 10 h gleichbleibend ist und nach 24 h leicht ansteigt.

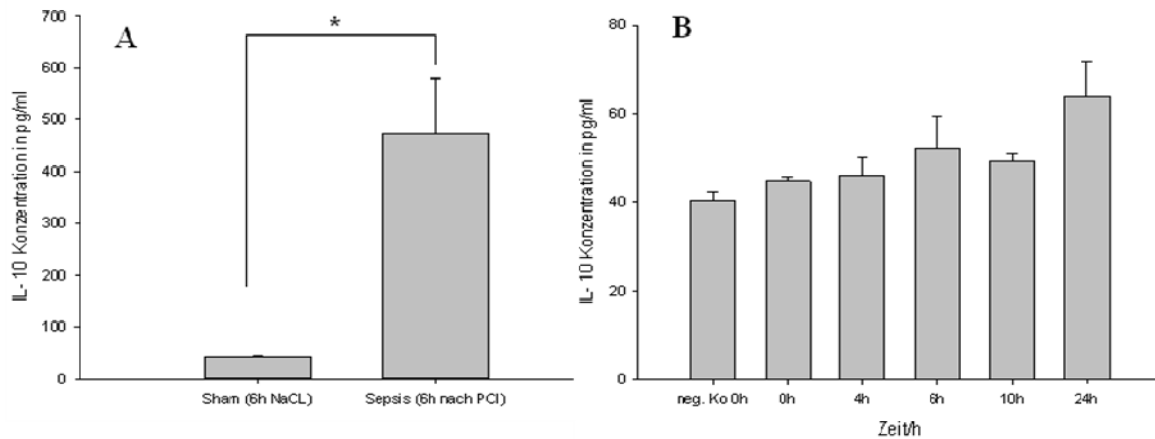


Abb. 31: IL-10-Konzentration in den Seren der Mäuse (A) sowie in den Überständen der EBs an Tag 18 abgenommen nach Ko-Inkubation mit *E. coli* (B), die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW \pm SEM der zugehörigen Kontrolle gesetzt * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

5.9.4.6 Interleukin-12 p70 (IL-12p70)

IL-12 aktiviert T-Zellen und wird u. a. von Makrophagen gebildet. Für die IL-12-Konzentration in Abb. Nr. 32 konnte weder in den Mausseren (A) noch in den Überständen der EBs nach inflammatorischer Induktion (B) ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen gezeigt werden. Bei den Mausseren (A) kann man tendenziell eine Erhöhung der IL-12-Konzentration bei der mit Sepsis induzierten Maus beobachten. In den Überständen (B) zeigt sich eine ansteigende Tendenz jedoch kein signifikanter Unterschied.

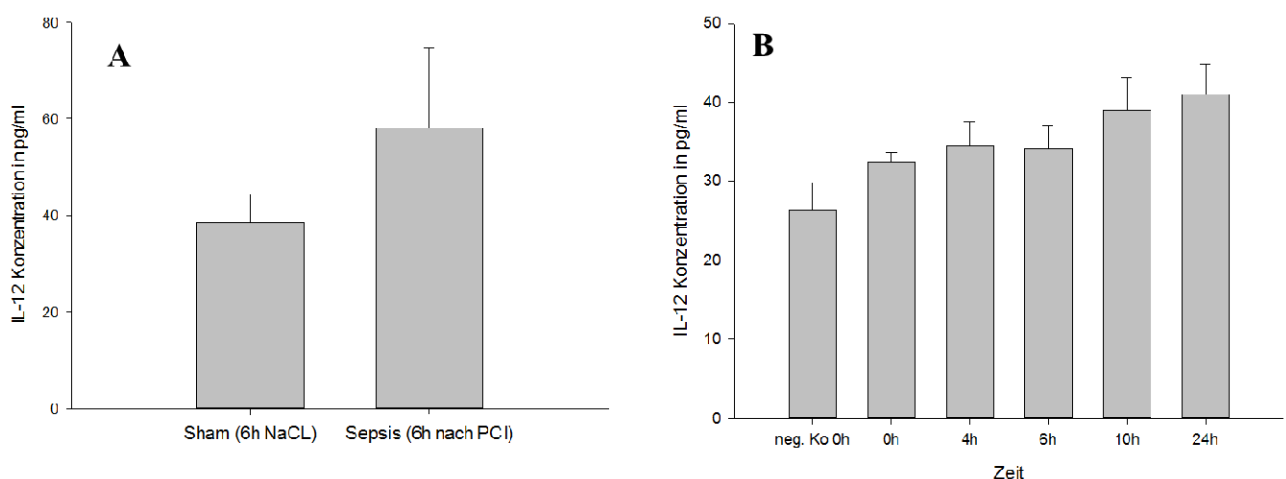


Abb. 32: IL-12p70-Konzentration in den Seren der Mäuse (A) sowie in den Überständen der EBs an Tag 18 abgenommen nach Ko-Inkubation mit *E. coli* (B), die Signifikanz ist in Bezug auf den gepoolten MW \pm SEM der zugehörigen Kontrolle gesetzt * = $p < 0,05$, Anzahl der Experimente $n = 3$

6 Diskussion

Es ist hinreichend bekannt und anhand von Literaturstellen belegt, dass ES kultiviert als 3-D-förmige Aggregate zu einer chronologischen Differenzierung von immunologischen Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lage sind (Hannig et al. 2010 , Keller et al. 1993, Kaufman et al. 2001, de Pooter et al. 2003). Es ist allerdings wenig über ihre Funktionalität im Rahmen der bakteriellen Kapazität und Aktivierung bekannt. Anhand von murinen CGR8-abgeleiteten EBs im Vergleich zu *in vivo* gewonnenen Proben der Maus soll die immunologische Funktionalität der EBs untersucht und abgeschätzt werden. Die EBs werden dazu 18 Tage in Kultur gehalten. Der Zeitpunkt der Untersuchung wurde gewählt, da die Trächtigkeit der Maus nach Befruchtung ca. 18-23 Tage beträgt und somit die Vergleichbarkeit von *in vitro* zu *in vivo* Ergebnissen besser ins Verhältnis gesetzt werden kann. Nach 18 Tagen Kultivierung wurden ausschließlich EBs verwendet die lichtmikroskopisch kontrahierende kardiomyozytenähnliche Areale ausbilden. Diese Selektion wurde durchgeführt, um am Beispiel des Kardiomyozyten pathophysiologische Prozesse während der Inflammation zu beobachten.

6.1 Antibakterielle Kapazität und Aktivierung von EBs

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass auch murine CGR8-abgeleitete Stammzellen in der Lage sind sich in immunologische Zellen des angeborenen Immunsystems zu differenzieren. Es konnten mit Hilfe von Immunfluoreszenzverfahren spezifische Oberflächenantigene wie CD45, CD11b und F4/80 auf differenzierten Zellen dargestellt werden. EBs und immunologisch aktive Zellen des angeborenen Immunsystems sind in der Lage, über PRRs sogenannte PAMPs zu erkennen und zu binden. Durch diesen Prozess werden die immunologischen Zellen aktiviert. Dieser, an ES bereits untersuchte, Prozess wurde in dieser Arbeit genutzt, um die differenzierten immunologischen Zellen zu aktivieren (Foldes et al. 2010). Die 18 Tage kultivierten und differenzierten EBs wurden mit lebenden E. coli-Bakterien ko-inkubiert. Der Baustein der bakteriellen Zellwand der E.coli, das LPS, ist eines der am besten untersuchtesten PAMPs. Diese Technik mit lebenden Bakterien wurde gewählt, da die immunologische Aktivierung nur durch PAMPs wie LPS, Flagellin usw. häufig nicht zu einer zufriedenstellenden Aktivierung der immunologischen Zellen geführt hat (Foldes et al. 2010). Die Ergebnisse zeigen, dass hierdurch eine Immunreaktion in Gang gesetzt werden konnte. Die beobachtete Immunreaktion konnte signifikant bestätigt werden, indem die

Dichte des Mediums mit E. coli und den EBs gemessen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Dichte des Mediums bei den EBs ko-inkubiert mit E. coli abnahm im Vergleich zu der Negativkontrolle mit Fibroblasten, die keine Immunkompetenz aufwiesen (5.5). Dies ließ die Hypothese zu, dass die differenzierten Zellen des angeborenen Immunsystems zur Phagozytose fähig sind.

6.2 Identifizierung und Isolierung von phagozytotisch aktiven Zellen

Die Phagozytose der Pathogene ist essentiell für die Wirksamkeit der immunologischen Antwort bei der Sepsis und ist deshalb Mittelpunkt dieser Arbeit. Grundlage der Identifizierung und Isolierung phagozytotisch aktiver Zellen innerhalb des Modells war die Überlegung, GFP- bzw. RFP-markierte E. coli als „Köder“ für die Immunzellen zu nutzen. Dafür wurden die GFP/RFP-markierten E. coli in flüssigem Medium vermehrt, ausplattiert und unter UV-Licht für die Versuche ausgewählt. Die EBs wurden mit GFP/RFP-markierte E. coli ko-inkubiert. Die Idee dahinter bestand darin, dass während der Inkubation die phagozytotisch aktiven Zellen die Fluoreszenz-markierten E. coli via Phagozytose aufnehmen. Die Inkubation erfolgte in einem Zeitintervall von 2 h, 4 h, 6 h und 8 h. Danach wurden die EBs für die FACS-Analyse aufbereitet. Die Isolierung der phagozytotisch aktiven Zellen erfolgte nach dem GFP/RFP-Signal mit Hilfe des FACS. Es gelang durch das GFP/RFP-Signal, spezifische phagozytotisch aktive Zellen zu isolieren. Die Ergebnisse zeigen signifikant, dass es möglich ist, mit dieser Methode phagozytotisch aktive Zellen, differenziert aus 18 Tage alten ES, zu isolieren und prozentual zu quantifizieren (5.2.). Es zeigte sich sogar eine prozentuale Zunahme der GFP/RFP positiven Zellen im zeitlichen Verlauf. Weitere Untersuchungen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen identifizierten die phagozytotisch aktiven Zellen als Makrophagen/Monozyten (5.3.). Das Oberflächenantigen F4/80 und auch die nach intrazellulär transportierten RFP-markierten E.coli konnten mit Hilfe des cLSM dargestellt werden. Die Methode, mit Hilfe von markierten Bakterien die verschiedenen Prozesse während der Phagozytose zu untersuchen, ist bekannt (Berger et al. 2010), wurde allerdings noch nicht in dieser Art für die Untersuchung der phagozytotischen Aktivität von EBs verwendet.

6.3 Steuerbarkeit der ES hinsichtlich ihrer phagozytotischen Aktivität

Für die Praktikabilität der aus 18 Tage kultivierten EB's als Modellsystem für die Pathogenese der Sepsis ist die Steuerbarkeit der Phagozytose von großer Bedeutung. Andererseits sollte gezeigt werden, dass die Phagozytose der differenzierten EBs ein per se gerichteter Prozess ist und nicht ein zufällig eingetretendes Ereignis. Die differenzierten 18 Tage kultivierten EBs wurden mit Cytochalasin D ko-inkubiert. Das Cytochalasin D ist ein Aktinpolymerase-Inhibitor. Die Polymerisation des Aktins ist ein unerlässlicher Vorgang bei der Phagozytose, wird dieser durch Anlagerung des Cytochalasins unterbunden, ist es den Zellen nicht möglich, Partikel nach intrazellulär zu transportieren. Es erfolgte eine ko-Inkubation von Cytochalasin D mit GFP-markierten E. coli über 8 h. Die Ergebnisse zeigen signifikant, dass durch 8 h-ko-Inkubation der EBs mit Cytochalasin D die GFP-markierten E. coli extrazellulär zwischen den EBs verbleiben. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe des FACS und zeigt eindrucklich, dass die phagozytotische Aktivität der EBs steuerbar und ein gerichteter Vorgang ist (5.4) und das Cytochalasin *in vitro* die Phagozytose hemmt.

6.4 Immunologische Reaktion der phagozytotisch aktiven Zellen

Die Aktivierung der phagozytotisch aktiven Zellen erfolgt bei der Sepsis durch E. coli über das Oberflächenmolekül CD14 und den TLR4 und wurde anhand von CGR8-abgeleiteten murinen EBs bereits untersucht (Finkensieper et al. 2012) und ist in dieser Arbeit deshalb nicht noch einmal gesondert bearbeitet worden. Es konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich das CD14-Oberflächenmolekül der Makrophagen/Monozyten für die Interaktion mit dem LPS der bakteriellen Zellwand der E. coli verantwortlich ist. Es löst in den Makrophagen/Monozyten die Sekretion spezifischer Zytokine aus. Um die immunologische Reaktion der 18 Tage kultivierten EBs zu beurteilen, wurden aus Überständen der EBs typische pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine bestimmt. Die Bestimmung erfolgte in einem Zeitintervall von 0 h- 24 h via Ko-Inkubation mit E. coli. Die Ergebnisse der Zytokinbestimmung der Überstände der EBs wurden mit dem Serumspiegel von mit Sepsis induzierten Mäusen verglichen (Blackwell and Christman 1996, Moore et al. 1998), um ein *in vitro/in vivo* Vergleich durchzuführen. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass das Zytokin TNF- α , das bei Patienten mit Sepsis und schwereren Infektionen ansteigt, auch in den Überständen der ES nachzuweisen ist (Blackwell and Christman 1996, Moore et al. 1998). Es konnte sogar im Zeitintervall ein kontinuierlicher

Anstieg der TNF- α -Konzentrationen im Überstand gezeigt werden. Dieses spricht für eine kontinuierliche Aktivierung der Makrophage/Monozyten mit einer funktionierenden immunologischen Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus. Ein weiteres nachgewiesenes Zytokin ist IL-6, das als unspezifischer Marker bei Infektionen des Erwachsenen allerdings als spezifischer Marker bei Säuglingen und Kleinkindern von Bedeutung ist. Auch das MCP-1 als chemotaktisches Zytokin für die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen zum Ort der Entzündung konnte detektiert werden. TNF- α , IL-6 und MCP-1 zeigten synergistische Ergebnisse mit den Serumspiegeln der Mäuse mit Sepsisinduktion. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass sich das anti-inflammatorische IL-10 und das auf Makrophagen/Monozyten autokrin wirkende IL-12 in den EBs abweichend zu den Ergebnissen der Serumspiegel der Maus verhielt. Dieses könnte auf die überschießende pro-inflammatorische Reaktion auf den inflammatorischen Reiz erklärt werden. Dieses Ungleichgewicht von pro- und anti-inflammatorischer Reaktion ist Teil der Pathogenese der Sepsis und u.a. für die hohe Mortalität dieser Erkrankung mitverantwortlich.

6.5 Pathophysiologische Aspekte der septischen Kardiomyopathie an ES

Um pathophysiologische Prozesse der Inflammation am Beispiel des Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden als erstes die sich aktiv kontrahierenden schlagenden Areale der EBs über die Zeit beobachtet. Dazu wurden zu definierten Zeitpunkten markierte Areale betrachtet und auf ihre Aktivität während der Ko-Inkubation mit *E. coli* überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass nach 10 h einige der Areale nicht mehr aktiv waren und nach 24 h der inflammatorische Stimulus für die EBs letal war (Abb. Nr. 16). Unbehandelte septische Infektionen zeigen bei Patienten auch einen schnellen tödlichen Ausgang. Zu klinischen Frühsymptomen der Sepsis gehört u.a. die Tachykardie (Dellinger et al. 2008). Um die Tachykardie an den EBs über ein Zeitintervall nachzuweisen, wurden die EBs mit *E. coli* koinkubiert, schlagende Areale markiert und zu definierten Zeitpunkten die Schlagfrequenz gezählt (Abb. Nr. 23). Die EBs zeigen genau, wie es bei einer schweren septischen Infektion erwartet wird, dass nach 4 h und 6 h die Herzfrequenz deutlich ansteigt. Zu den Untersuchungen der Frequenz und der schlagenden Areale ebenso wie für die Kontraktilität, die im Rahmen der septischen kardialen Dysfunktion eintritt und noch von Interesse ist, gibt es keine Vergleichsdaten mit lebenden Mäusen, da diese Untersuchungen schwierig und mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich waren. Zur Quantifizierung einer Schädigung der quergestreiften Muskulatur des Herzens dient im klinischen Alltag das cTnI.

Das cTnI ist Teil des kontraktilen Apparates der quergestreiften Muskulatur des Herzens und wird bei Schädigung freigesetzt. Mit Hilfe eines ELISA wurde die cTnI Konzentration in den Überständen der EBs zu zwei Zeitpunkten ermittelt. Die ES zeigten einen signifikanten Anstieg nach 10 h und 24 h mit fortgeschrittener Sepsisinduktion (Abb.Nr. 25). Auch der Serumspiegel der Mäuse mit induzierter Sepsis zeigte einen Anstieg. Die ermittelten Daten spiegeln somit die bereits wissenschaftlich belegten Untersuchungen wieder, dass bei fortgeschrittener septischer myokardialer Dysfunktion die Kontraktilität im Herzen in Folge der kardialen Schädigung abnimmt (Paoli et al. 2006). Zur frühzeitigen Detektion eines septischen Geschehens wird das PCT zu Rate gezogen und ist derzeit einer der sensitivsten Marker. Aus diesem Grund war er als Bestandteil dieser Arbeit ebenfalls von großem Interesse und wurde mit Hilfe eines ELISA sowohl in den Überständen der EBs als auch in den Seren der Mäuse mit Sepsisinduktion quantifiziert (Abb. Nr. 26). Die Ergebnisse zeigen *in vivo* als auch *in vitro*, dass das PCT sich auch hier als signifikanter Sepsismarker eignet und Werte > 2ng/ml nachgewiesen werden können. Wie bereits unter 2.6 erörtert, wird vermutet, dass das PCT bei schweren septischen Infektionen hauptsächlich in der Leber und weniger in seinem Ursprungsgewebe der Schilddrüse gebildet wird. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den 18 Tage kultivierten embryonalen Stammzellen um einen vielfältiges zelluläres Konglomerat handelt, das natürlich auch embryonales Gewebe anderer Organe wie z.B. der Leber oder Schilddrüse differenziert, die ihrerseits auf die Sepsisinduktion mit Produktion des PCTs reagieren. Dadurch wird es erst möglich, das PCT zu messen und zu quantifizieren, es war somit nicht unbedingt zu erwarten, dass das Modellsystem der murinen EBs in der Lage ist PCT zu bilden.

6.6 Rolle der ROS bei der septischen kardialen Dysfunktion

In einem ersten Vorversuch wurde die Generierung der ROS nach Sepsisinduktion durch PCI am Herzgewebe der septischen Maus untersucht. Dazu wurden kryostatisch hergestellte Schnitte vom Herzen der Maus mit DAB inkubiert. Das DAB bildet mit H₂O₂ einen braunen Niederschlag, der lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Bildvergleichs ausgewertet wurde. Der Bildvergleich ist vom wissenschaftlichen Standpunkt her gesehen ein sehr subjektives Verfahren. In diesem Fall zeigte es jedoch, dass mit Hilfe von histochemischen Verfahren eine Tendenz zur vermehrten ROS-Produktion bei Herzgewebe von Mäusen mit Sepsisinduktion besteht. In einem zweiten Vorversuch wurde die immunologische Kapazität der ES hinsichtlich der Produktion von ROS untersucht. Dazu wurden 18 Tage in 24-Well-

Platten kultivierte EBs mit septischen und nicht-septischen (Sham) Serum von Mäusen konfrontiert. Die Produktion der EBs von H₂O₂ wurde durch DCF mit Hilfe des cLSM sichtbar gemacht. Die Zunahme der Fluoreszenz über 20 min ist in Abb. Nr. 17 visuell dargestellt und graphisch ausgewertet. Es zeigt, dass EBs zur Generierung von ROS in der Lage sind und auch über die Länge der Konfrontation die ROS-Generierung ansteigt. Da die Produktion von ROS in einem engen Zusammenhang mit Endothelschädigung, Inflammation und vielen weiteren pathologischen Prozessen, u. a. auch des septischen Schocks durch kardiale Dysfunktion, steht, (Salvemini and Cuzzocrea 2002) war nun von Interesse, ob es sich bei der NADPH-Oxidase um die von Makrophagen im *respiratory burst* generierte NOX2 handelt. Studien zeigen eine vermehrte NOX2-Generierung in EBs nach Ko-Inkubation mit E. coli und ein Zusammenhang der Hochregulierung von NOX2 mit der Aktivierung des TLR4 durch LPS (Frantz et al. 2007). In diesem Kontext wurde zuerst immunhistochemisch sowohl am Herzgewebe der septischen Mäuse als auch an den EBs mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten-AK die NOX2 dargestellt. Dieses gelang sowohl bei dem Herzgewebe der septischen Mäuse als auch bei den ES. In Abb. Nr. 21 ist sichtbar, dass sich NOX2 im Herzgewebe am cLSM lokal wie in einer Zelle verteilt darstellt. Was zu der These führte, dass nicht nur die ROS-Produktion sondern eventuell auch residente kardiale Makrophagen zwischen den Kardiomyozyten wesentlich zu dem klinischen Bild der septischen kardialen Dysfunktion beitragen könnten. Um die NOX2 Generierung weiter zu untersuchen, wurde mit Hilfe der RTD-PCR die mRNA-Expression von NOX2 im Herzgewebe der Maus und im Modellsystem der ES mit Hilfe des Western Blots die Proteinexpression von NOX2 quantifiziert. Eine Hochregulierung konnte in beiden Fällen gezeigt werden. Dieses zeigt, dass die EBs in der Lage sind, NOX2 als Antwort auf inflammatorische Prozesse zu generieren und somit die antibakterielle Kapazität hinsichtlich der Pathogenabwehr auch *in vitro* besteht.

6.7 Genexpression von CD11b, F4/80 und CD 68 am Herzgewebe der Maus

Die mRNA Expression von CD11b, F4/80 und CD68 wurde im Herzgewebe von septischen Mäusen betrachtet, um zu untersuchen, ob diese als ROS-Quelle bei der septischen myokardialen Dysfunktion infrage kommen. Die Gewebe-residenten Makrophagen sind sehr heterogen und erfüllen spezifische aber auch unspezifische Aufgaben, die während der Entwicklung und Ausdifferenzierung zu adultem Gewebe von Nöten sind (Davies et al. 2013). Aus diesem Grund wurden drei für Makrophagen spezifische Oberflächenantigene

untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine signifikante Hochregulierung von CD11b bei der Maus mit induzierter Sepsis im Gegensatz zu der Sham-Maus nachzuweisen ist. Die sogenannten M1-Makrophagen, die u.a. das Oberflächenantigen CD11b tragen, werden durch das LPS der E.coli aktiviert und wandern daraufhin vermehrt aus der Blutbahn in das septische myokardiale Gewebe ein. Wie in 6.6. bereits beschrieben ist, sind diese Makrophagen auch im *in vitro* Modell zur ROS-Generierung hauptsächlich der NOX2 in der Lage. NOX2 gilt u. a. als die Makrophagen-spezifische NOX (Bedard and Krause 2007). Die ROS-Generierung ist eine Erklärung für die kardiale Dysfunktion während einer Sepsis. Desweiteren ist der Oberflächenmarker F4/80 ebenfalls hochreguliert, jedoch nicht signifikant. Dieses gibt Grund zu der Annahme, dass tendenziell nicht nur durch die ROS-Generierung sondern auch die massive Einwanderung von Makrophagen in das Herzgewebe der Maus zu Strukturveränderung im physiologischen Aufbau des Herzens führt. Durch diese Strukturveränderungen könnten die Kardiomyopathie bedingten Veränderungen ebenfalls erklärt werden. Desweiteren wurde die Genexpression des Oberflächenmarkers CD68 untersucht, der im Gegensatz zu CD11b und F4/80 keine Hochregulierung zeigt. Stattdessen ist die Genexpression von CD68 erniedrigt. Veröffentlichungen zeigen, dass Makrophagen, die den Oberflächenmarker CD68 tragen, hauptsächlich in der Leber als Kupfersche Sternzellen und in der Lunge als Alveolar-Makrophagen zu finden sind (Davies et al. 2013). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass CD11b und tendenziell auch F4/80 positive Makrophagen als Gewebe-spezifische residente Makrophagen bei der Sepsis im Herzen zu finden sind. Bis heute ist nicht klar, inwieweit inflammatorische von Monozyten abgeleitete Makrophagen und residente Gewebe-abhängige Makrophagen miteinander kooperieren und bei entzündlichen Prozessen interagieren.

6.8 Transfer von immunkompetenten Zellen als Sepsistherapie mit Hilfe von ES

Bis heute gibt es noch kein suffizientes Verfahren um Monozyten/Makrophagen differenziert aus EBs der Maus zu reinigen und funktionserhaltend zu selektieren. Es sind zwei Methoden bekannt, mit denen Monozyten/Makrophagen aus dem peripheren Blut oder aus der Peritonealhöhle der Maus gewonnen werden können. Diese Methoden basieren auf dem Prinzip der Detektion der Monozyten/Makrophagen mithilfe ihrer spezifischen Oberflächenantigene. Spezifische AK detektieren spezifische Oberflächenantigene wodurch eine Selektion der gewünschten Population möglich wird. Allerdings ist diese Methode mit dem Nachteil behaftet, dass die Zellen eine Beeinträchtigung ihrer Funktion zeigen. Mit der in

dieser Arbeit vorgestellten Methode, ist es möglich, immunkompetente Makrophagen mit Hilfe von GFP/RFP-markierten E. coli zu selektieren und zwar mit Hilfe ihrer phagozytotischen Aktivität. Diese Methode ist nicht nur selektiv, sondern zeigt auch, dass die detektierten Leukozyten bzw. Makrophagen rein und vital, d.h in ihrer Funktion nicht eingeschränkt sind (Finkensieper et al. 2012). Zellen, die durch Endozytose von GFP/RFP-markierten E. coli gewonnen werden, könnten in Zukunft in der Sepsistherapie von Patienten mit einer eingeschränkten Immunantwort genutzt werden. Es gibt bereits Veröffentlichung, bei denen es gelungen ist, bei Mäusen mit Sepsis durch intraperitoneale Applikation von CD34+-positiven Zellen die Immunreaktion wieder herzustellen. Die CD34+-Zellen sind junge hämatopoetische Zellen, die sich nach Applikation zu immunologisch aktiven Zellen, d.h. Leukozyten und Makrophagen differenzieren und so zu höheren Überlebensraten der Sepsismäuse geführt haben (Brudecki et al. 2012). Durch die Differenzierungszeit, die die CD 34+- Zellen benötigen, sind sie allerdings nur in späten Phasen der Inflammation bei der Sepsis therapeutisch wirksam. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode und die Möglichkeit der direkten Applikation von Makrophagen braucht die Differenzierungszeit nicht und würde damit auch schon in frühen Phasen der Inflammation bei der Sepsis einen therapeutischen nutzen haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die beobachtete antibakterielle Kapazität der murinen ES eine potentiell neue Behandlungsstrategie von Sepsis-Patienten durch Applikation von Makrophagen möglich sein kann. Des Weiteren konnten in weiterführenden Untersuchungen der murinen ES gezeigt werden, dass sie zur Differenzierung von CD19 positiven Zellen in der Lage sind (Finkensieper et al. 2012). Durch diese Beobachtung könnte man sogar noch einen Schritt weiter gehen und in Zukunft sogar die Möglichkeit haben, AG-präsentierende und Cytokin sezernierende unreife B-Zellen zu selektieren und in der Sepsistherapie einzusetzen.

7 Schlussfolgerung

Grundlegend waren die Untersuchungen hinsichtlich der antibakteriellen Differenzierungsfähigkeit der ES, um am Beispiel der Sepsis die Immunkompetenz der ES zu untersuchen. Es zeigte sich, dass murine ES der Zelllinie CGR8, die 18 Tage kultiviert wurden, Zellen des angeborenen Immunsystems mit den Oberflächenantigenen CD45, CD11b, F4/80 und CD45 differenzieren. Da für den *in vivo/in vitro*-Vergleich der Pathophysiologie der Sepsis auch die phagozytotische Kompetenz der detektierten Zellen von großer Bedeutung war, wurden die murinen ES mit GFP/RFP-markierten *E. coli* ko-inkubiert. Es konnte visuell ein Transport der markierten *E. coli* nach intrazellulär dargestellt werden. Auch die FACS-analytische Auswertung zeigt ein steigendes Phagozytosepotenzial der differenzierten murinen ES über die Zeit. Auch die Phagozytose von multiresistenten Keimen konnte indirekt über die Dichteabnahme des Mediums gezeigt werden. Um nachzuweisen, dass es sich bei der Phagozytose der differenzierten ES um einen per se gerichteten Vorgang handelt, wurde die Phagozytose durch Cytochalasin erfolgreich verhindert.

Ein Großteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Vergleich von pathophysiologischen Vorgängen der Sepsis von *in vitro* Verhältnissen der ES zu *in vivo* Verhältnissen bei Mäusen mit induzierter Sepsis. Dazu wurden die ES mit *E. coli* ko-inkubiert und die Mäuse durch eine intraperitoneale Fäciesinjektion infiziert. In einem Vorversuch wurde die Reagibilität der ES auf die Sepsisinduktion überprüft. Hierzu wurden die Schlagfrequenz und die schlagenden Areale über die Zeit gezählt. Es zeigte sich eine Verminderung der schlagenden Areale und eine Zunahme der Schlagfrequenz nach 4 h und 6 h. Diese Beobachtungen zeigten, dass die ES auf den Sepsisreiz reagieren. Es zeigten sich signifikante und *in vitro* und *in vivo* vergleichbare Ergebnisse für cTnI, PCT, die ROS-Generierung und die Untersuchung bezüglich NOX2. Bei den Zytokinen zeigten sich für INF- γ , TNF- α , IL-6 und MCP-1 *in vivo* und *in vitro* vergleichbare Ergebnisse, die die Funktionalität hinsichtlich der immunologischen Kompetenz zur Sekretion von Mediatoren der ES bewies. Weniger eindruckliche Ergebnisse zeigten die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-12. Desweiteren wurde die Genexpression von CD11b, F4/80 und CD68 im Herzgewebe der Maus untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Hochregulation für CD11b, tendenziell allerdings nicht signifikant auch eine Hochregulation für F4/80 und eine Runterregulation bei CD68. Dieses sprach für eine vermehrte Einwanderung von Makrophagen in das Herzgewebe während der Sepsis. Die vermehrte Einwanderung der Makrophagen könnte neben der ROS-Generierung auch Grund von Strukturveränderungen im Herzgewebe sein und so die

myokardialen Dysfunktion bei der Sepsis mit erklären. Diese Untersuchung erfolgte nicht im *in vivo/in vitro* Vergleich, was die Grenzen des Modellsystems aufzeigt.

Abschließend zeigt das Modell der murinen embryonalen Stammzellen als Sepsismodell hohes Potenzial. Auf der Suche nach Alternativen zu Tierversuchen zeigt das Modell der ES eine gute Vergleichbarkeit zu den *in vitro* Ergebnissen der Mäuse hinsichtlich der molekularen und pathophysiologischen Vorgänge der Sepsis. Eine Schwäche des Modells sind klinische Untersuchungen, wie z.B. die der Kontraktilität, die das Modell nur mit hohem technischem Aufwand bewältigen kann. Dafür ist das Modell in der Lage, neue Therapieoptionen der Sepsis aufzuzeigen. Die vorgestellte Methode, Makrophagen mit Hilfe von GFP/RFP-markierten E.coli aufgrund ihrer phagozytotischen Aktivität zu detektieren und weiter in der klinischen Anwendung zu nutzen, könnte eine neue Therapieform darstellen.

8 Literaturverzeichnis

Abello, P. A., et al. (1994). "Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin." Arch Surg **129**(2): 134-140; discussion 140-131.

Aderka, D., et al. (1989). "IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice." J Immunol **143**(11): 3517-3523.

Arditi, M., et al. (1993). "Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14." Infect Immun **61**(8): 3149-3156.

Avilion, A. A., et al. (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." Genes Dev **17**(1): 126-140.

Babior, B. M., et al. (1973). "Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent." J Clin Invest **52**(3): 741-744.

Baldrige CW, G. R. (1933). "The extra respiration of phagocytosis."

Bancroft, G. J., et al. (1994). "Pathways of macrophage activation and innate immunity." Immunol Lett **43**(1-2): 67-70.

Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.

Berger, S. B., et al. (2010) "SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages." Nat Immunol **11**(10): 920-927.

Blackwell, T. S. and J. W. Christman (1996). "Sepsis and cytokines: current status." Br J Anaesth **77**(1): 110-117.

Blanco, J., et al. (2008). "Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study." Crit Care **12**(6): R158.

Bone, R. C., et al. (1997). "Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process." Chest **112**(1): 235-243.

Bone, R. C. e. a. (1992). "American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis." Crit Care Med **20**(6): 864-874.

Borregaard, N., et al. (1983). "Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation." J Cell Biol **97**(1): 52-61.

Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-716.

- Bradley, A., et al. (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." Nature **309**(5965): 255-256.
- Brudecki, L., et al. (2012). "Hematopoietic stem-progenitor cells restore immunoreactivity and improve survival in late sepsis." Infect Immun **80**(2): 602-611.
- Brunkhorst, F. M. (2006). "[Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]." Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther **41**(1): 43-44.
- Buggisch, M., et al. (2007). "Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase." J Cell Sci **120**(Pt 5): 885-894.
- Celada, A. and C. Nathan (1994). "Macrophage activation revisited." Immunol Today **15**(3): 100-102.
- Chambers, I., et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-655.
- Chapman, P. B., et al. (1987). "Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer." J Clin Oncol **5**(12): 1942-1951.
- Charpentier, J., et al. (2004). "Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis." Crit Care Med **32**(3): 660-665.
- Davies, K. J. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects." J Biol Chem **262**(20): 9895-9901.
- Davies, L. C., et al. (2013). "Tissue-resident macrophages." Nat Immunol **14**(10): 986-995.
- de Pooter, R. F., et al. (2003). "In vitro generation of T lymphocytes from embryonic stem cell-derived prehematopoietic progenitors." Blood **102**(5): 1649-1653.
- de Pooter, R. F., et al. (2005). "In vitro generation of lymphocytes from embryonic stem cells." Methods Mol Biol **290**: 135-147.
- Dellinger, R. P., et al. (2008). "Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008." Crit Care Med **36**(1): 296-327.
- Deshmane, S. L., et al. (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." J Interferon Cytokine Res **29**(6): 313-326.
- Dinarello, C. A. (1991). "Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism." Blood **77**(8): 1627-1652.
- Dinarello, C. A., et al. (1993). "Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome." Jama **269**(14): 1829-1835.

- Doetschman, T. C., et al. (1985). "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." J Embryol Exp Morphol **87**: 27-45.
- Drab, M., et al. (1997). "From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model." Faseb J **11**(11): 905-915.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156.
- Fassler, R. and M. Meyer (1995). "Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice." Genes Dev **9**(15): 1896-1908.
- Finkensieper, A., et al. (2012). "Antibacterial capacity of differentiated murine embryonic stem cells during defined in vitro inflammatory conditions." Stem Cells Dev **22**(14): 1977-1990.
- Fischer, E., et al. (1992). "Interleukin-1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance in Escherichia coli septic shock, but fails to alter host responses to sublethal endotoxemia." J Clin Invest **89**(5): 1551-1557.
- Flierl, M. A., et al. (2008). "Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis." Mol Med **14**(5-6): 327-336.
- Foldes, G., et al. (2010). "Innate immunity in human embryonic stem cells: comparison with adult human endothelial cells." PLoS One **5**(5): e10501.
- Frantz, S., et al. (2007). "Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **4**(8): 444-454.
- Garcia, R. C. and A. W. Segal (1984). "Changes in the subcellular distribution of the cytochrome b-245 on stimulation of human neutrophils." Biochem J **219**(1): 233-242.
- Gauldie, J., et al. (1987). "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7251-7255.
- Gerard, C., et al. (1993). "Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia." J Exp Med **177**(2): 547-550.
- Guan, K., et al. (1999). "Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro." Cytotechnology **30**(1-3): 211-226.
- Hagel, S. and F. Brunkhorst (2011). "Intensivmedizin und Notfallmedizin." German Interdisciplinary Journal of Intensive Care Medicine.
- Hannig, M., et al. (2010). "Control of leucocyte differentiation from embryonic stem cells upon vasculogenesis and confrontation with tumour tissue." J Cell Mol Med **14**(1-2): 303-312.

- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.
- Haziot, A., et al. (1996). "Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice." Immunity **4**(4): 407-414.
- Heinzel, B., et al. (1992). "Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase." Biochem J **281** (Pt 3): 627-630.
- Hensler, T., et al. (2003). "The clinical value of procalcitonin and neopterin in predicting sepsis and organ failure after major trauma." Shock **20**(5): 420-426.
- Hescheler, J., et al. (1999). "Establishment of ionic channels and signalling cascades in the embryonic stem cell-derived primitive endoderm and cardiovascular system." Cells Tissues Organs **165**(3-4): 153-164.
- Heymes, C., et al. (2003). "Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure." J Am Coll Cardiol **41**(12): 2164-2171.
- Hubner, K., et al. (2003). "Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells." Science **300**(5623): 1251-1256.
- John, J., et al. (2010). "Troponin-I as a prognosticator of mortality in severe sepsis patients." J Crit Care **25**(2): 270-275.
- Kaufman, D. S., et al. (2001). "Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10716-10721.
- Keller, G., et al. (1993). "Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture." Mol Cell Biol **13**(1): 473-486.
- Kolossov, E., et al. (1998). "Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein." J Cell Biol **143**(7): 2045-2056.
- Kramer, J., et al. (2000). "Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4." Mech Dev **92**(2): 193-205.
- Kukreja, R. C., et al. (1986). "PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH." Circulation Research **59**(6): 612-619.
- Lai, C. S. and L. H. Piette (1977). "Hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation of rat liver microsomes." Biochem Biophys Res Commun **78**(1): 51-59.
- Landesberg, G., et al. (2014). "Troponin elevation in severe sepsis and septic shock: the role of left ventricular diastolic dysfunction and right ventricular dilatation*." Crit Care Med **42**(4): 790-800.
- Lauw, F. N., et al. (1999). "Interleukin-12 induces sustained activation of multiple host inflammatory mediator systems in chimpanzees." J Infect Dis **179**(3): 646-652.

Lee, K., et al. (2011) "Spontaneous and aging-dependent development of arthritis in NADPH oxidase 2 deficiency through altered differentiation of CD11b⁺ and Th/Treg cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(23): 9548-9553.

Lefer, A. M. (1970). "Role of a myocardial depressant factor in the pathogenesis of circulatory shock." Fed Proc **29**(6): 1836-1847.

Levy, M. M., et al. (2003). "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." Crit Care Med **31**(4): 1250-1256.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Maltsev, V. A., et al. (1994). "Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents." Circulation Research **75**(2): 233-244.

Metzger, J. M., et al. (1996). "Vital staining of cardiac myocytes during embryonic stem cell cardiogenesis in vitro." Circulation Research **78**(4): 547-552.

Moore, K. J., et al. (1998). "In vitro-differentiated embryonic stem cell macrophages: a model system for studying atherosclerosis-associated macrophage functions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(10): 1647-1654.

Morrison, D. C. and J. L. Ryan (1987). "Endotoxins and disease mechanisms." Annu Rev Med **38**: 417-432.

Mudd, E. B. and S. Mudd (1933). "The Process of Phagocytosis : the Agreement between Direct Observation and Deductions from Theory." J Gen Physiol **16**(4): 625-636.

Mullis, K., et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

Munoz, C., et al. (1991). "Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis." J Clin Invest **88**(5): 1747-1754.

Nathan, C. F., et al. (1983). "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." J Exp Med **158**(3): 670-689.

Nathan, C. F., et al. (1984). "Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma." J Exp Med **160**(2): 600-605.

Newburger, P. E., et al. (1988). "Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5215-5219.

Nichols, J., et al. (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-391.

Nijsten, M. W., et al. (2000). "Procalcitonin behaves as a fast responding acute phase protein in vivo and in vitro." Crit Care Med **28**(2): 458-461.

Oberhoffer, M., et al. (1999). "Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro." J Lab Clin Med **134**(1): 49-55.

Okabe, E., et al. (1985). "Inhibition by free radical scavengers and by cyclooxygenase inhibitors of the effect of acidosis on calcium transport by masseter muscle sarcoplasmic reticulum." Biochem Pharmacol **34**(7): 961-968.

Oudot, A., et al. (2003). "Angiotensin II activates NADPH oxidase in isolated rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion." Eur J Pharmacol **462**(1-3): 145-154.

Paoli, G., et al. (2006). "[Myocardial dysfunction during sepsis: epidemiology, prognosis and treatment]." G Ital Cardiol (Rome) **12**(12): 804-814.

Parrillo, J. E., et al. (1990). "Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy." Ann Intern Med **113**(3): 227-242.

Rietschel, E. T., et al. (1994). "Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function." Faseb J **8**(2): 217-225.

Robbins, J., et al. (1990). "Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro." J Biol Chem **265**(20): 11905-11909.

Rohwedel, J., et al. (1994). "Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents." Dev Biol **164**(1): 87-101.

Root, R. K. and J. A. Metcalf (1977). "H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. Relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H₂O₂: studies with normal and cytochalasin B-treated cells." J Clin Invest **60**(6): 1266-1279.

Rossi, F. and M. Zatti (1964). "Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells." Experientia **20**(1): 21-23.

Russwurm, S., et al. (1999). "Procalcitonin--a novel biochemical marker for the mediator-directed therapy of sepsis." Mol Med Today **5**(7): 286-287.

Sagy, M., et al. (2013). "Definitions and pathophysiology of sepsis." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care **43**(10): 260-263.

Salvemini, D. and S. Cuzzocrea (2002). "Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation." Free Radic Biol Med **33**(9): 1173-1185.

Schindler, R., et al. (1990). "Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF." Blood **75**(1): 40-47.

- Schlattmann, P. and F. M. Brunkhorst (2013). "Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis." Lancet Infect Dis **14**(3): 189.
- Schreck, R., et al. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." Embo J **10**(8): 2247-2258.
- Schumann, R. R., et al. (1994). "The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin." Med Microbiol Immunol **183**(6): 279-297.
- Selby, P., et al. (1987). "Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations." Br J Cancer **56**(6): 803-808.
- Serrano, F., et al. (2003). "NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain." Brain Res **988**(1-2): 193-198.
- Shalaby, M. R., et al. (1989). "Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo." Clin Immunol Immunopathol **53**(3): 488-498.
- Sies, H. and R. Mehlhorn (1986). "Mutagenicity of nitroxide-free radicals." Arch Biochem Biophys **251**(1): 393-396.
- Simon, L., et al. (2004). "Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis." Clin Infect Dis **39**(2): 206-217.
- Smith, A. G., et al. (1988). "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." Nature **336**(6200): 688-690.
- Strubing, C., et al. (1995). "Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons." Mech Dev **53**(2): 275-287.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.
- Tejada-Simon, M. V., et al. (2005). "Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus." Mol Cell Neurosci **29**(1): 97-106.
- Tomioka, I., et al. (2010). "Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28." Genes Cells **15**(9): 959-969.
- van der Poll, T., et al. (1995). "Interleukin-1 contributes to increased concentrations of soluble tumor necrosis factor receptor type I in sepsis." J Infect Dis **172**(2): 577-580.
- Vittet, D., et al. (1996). "Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps." Blood **88**(9): 3424-3431.
- Wartenberg, M., et al. (1998). "The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents." Lab Invest **78**(10): 1301-1314.

Westfall, M. V., et al. (1996). "Troponin I isoform expression is developmentally regulated in differentiating embryonic stem cell-derived cardiac myocytes." Dev Dyn **206**(1): 24-38.

Wiles, M. V. and G. Keller (1991). "Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture." Development **111**(2): 259-267.

Winkelstein, J. A., et al. (2000). "Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients." Medicine (Baltimore) **79**(3): 155-169.

Abello, P. A., et al. (1994). "Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin." Arch Surg **129**(2): 134-140; discussion 140-131.

Aderka, D., et al. (1989). "IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice." J Immunol **143**(11): 3517-3523.

Arditi, M., et al. (1993). "Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14." Infect Immun **61**(8): 3149-3156.

Avilion, A. A., et al. (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." Genes Dev **17**(1): 126-140.

Babior, B. M., et al. (1973). "Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent." J Clin Invest **52**(3): 741-744.

Baldrige CW, G. R. (1933). "The extra respiration of phagocytosis."

Bancroft, G. J., et al. (1994). "Pathways of macrophage activation and innate immunity." Immunol Lett **43**(1-2): 67-70.

Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.

Berger, S. B., et al. "SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages." Nat Immunol **11**(10): 920-927.

Blackwell, T. S. and J. W. Christman (1996). "Sepsis and cytokines: current status." Br J Anaesth **77**(1): 110-117.

Blanco, J., et al. (2008). "Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study." Crit Care **12**(6): R158.

Bone, R. C., et al. (1997). "Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process." Chest **112**(1): 235-243.

Bone, R. C. e. a. (1992). "American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis." Crit Care Med **20**(6): 864-874.

- Borregaard, N., et al. (1983). "Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation." J Cell Biol **97**(1): 52-61.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-716.
- Bradley, A., et al. (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." Nature **309**(5965): 255-256.
- Brudecki, L., et al. "Hematopoietic stem-progenitor cells restore immunoreactivity and improve survival in late sepsis." Infect Immun **80**(2): 602-611.
- Brunkhorst, F. M. (2006). "[Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]." Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther **41**(1): 43-44.
- Buggisch, M., et al. (2007). "Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase." J Cell Sci **120**(Pt 5): 885-894.
- Celada, A. and C. Nathan (1994). "Macrophage activation revisited." Immunol Today **15**(3): 100-102.
- Chambers, I., et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-655.
- Chapman, P. B., et al. (1987). "Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer." J Clin Oncol **5**(12): 1942-1951.
- Charpentier, J., et al. (2004). "Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis." Crit Care Med **32**(3): 660-665.
- Davies, K. J. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects." J Biol Chem **262**(20): 9895-9901.
- Davies, L. C., et al. (2013). "Tissue-resident macrophages." Nat Immunol **14**(10): 986-995.
- de Pooter, R. F., et al. (2003). "In vitro generation of T lymphocytes from embryonic stem cell-derived prehematopoietic progenitors." Blood **102**(5): 1649-1653.
- de Pooter, R. F., et al. (2005). "In vitro generation of lymphocytes from embryonic stem cells." Methods Mol Biol **290**: 135-147.
- Dellinger, R. P., et al. (2008). "Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008." Crit Care Med **36**(1): 296-327.
- Deshmane, S. L., et al. (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." J Interferon Cytokine Res **29**(6): 313-326.

- Dinareello, C. A. (1991). "Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism." Blood **77**(8): 1627-1652.
- Dinareello, C. A., et al. (1993). "Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome." Jama **269**(14): 1829-1835.
- Doetschman, T. C., et al. (1985). "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." J Embryol Exp Morphol **87**: 27-45.
- Drab, M., et al. (1997). "From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model." Faseb J **11**(11): 905-915.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156.
- Fassler, R. and M. Meyer (1995). "Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice." Genes Dev **9**(15): 1896-1908.
- Finkensieper, A., et al. "Antibacterial capacity of differentiated murine embryonic stem cells during defined in vitro inflammatory conditions." Stem Cells Dev **22**(14): 1977-1990.
- Fischer, E., et al. (1992). "Interleukin-1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance in Escherichia coli septic shock, but fails to alter host responses to sublethal endotoxemia." J Clin Invest **89**(5): 1551-1557.
- Flierl, M. A., et al. (2008). "Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis." Mol Med **14**(5-6): 327-336.
- Foldes, G., et al. "Innate immunity in human embryonic stem cells: comparison with adult human endothelial cells." PLoS One **5**(5): e10501.
- Frantz, S., et al. (2007). "Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **4**(8): 444-454.
- Garcia, R. C. and A. W. Segal (1984). "Changes in the subcellular distribution of the cytochrome b-245 on stimulation of human neutrophils." Biochem J **219**(1): 233-242.
- Gauldie, J., et al. (1987). "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7251-7255.
- Gerard, C., et al. (1993). "Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia." J Exp Med **177**(2): 547-550.
- Guan, K., et al. (1999). "Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro." Cytotechnology **30**(1-3): 211-226.

- Hagel, S. and F. Brunkhorst (2011). "Intensivmedizin und Notfallmedizin." German Interdisciplinary Journal of Intensive Care Medicine.
- Hannig, M., et al. "Control of leucocyte differentiation from embryonic stem cells upon vasculogenesis and confrontation with tumour tissue." J Cell Mol Med **14**(1-2): 303-312.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.
- Haziot, A., et al. (1996). "Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice." Immunity **4**(4): 407-414.
- Heinzel, B., et al. (1992). "Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase." Biochem J **281** (Pt 3): 627-630.
- Hensler, T., et al. (2003). "The clinical value of procalcitonin and neopterin in predicting sepsis and organ failure after major trauma." Shock **20**(5): 420-426.
- Hescheler, J., et al. (1999). "Establishment of ionic channels and signalling cascades in the embryonic stem cell-derived primitive endoderm and cardiovascular system." Cells Tissues Organs **165**(3-4): 153-164.
- Heymes, C., et al. (2003). "Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure." J Am Coll Cardiol **41**(12): 2164-2171.
- Hubner, K., et al. (2003). "Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells." Science **300**(5623): 1251-1256.
- John, J., et al. "Troponin-I as a prognosticator of mortality in severe sepsis patients." J Crit Care **25**(2): 270-275.
- Kaufman, D. S., et al. (2001). "Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10716-10721.
- Keller, G., et al. (1993). "Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture." Mol Cell Biol **13**(1): 473-486.
- Kolossov, E., et al. (1998). "Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein." J Cell Biol **143**(7): 2045-2056.
- Kramer, J., et al. (2000). "Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4." Mech Dev **92**(2): 193-205.
- Kukreja, R. C., et al. (1986). "PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH." Circulation Research **59**(6): 612-619.
- Lai, C. S. and L. H. Piette (1977). "Hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation of rat liver microsomes." Biochem Biophys Res Commun **78**(1): 51-59.

- Landesberg, G., et al. "Troponin elevation in severe sepsis and septic shock: the role of left ventricular diastolic dysfunction and right ventricular dilatation*." Crit Care Med **42**(4): 790-800.
- Lauw, F. N., et al. (1999). "Interleukin-12 induces sustained activation of multiple host inflammatory mediator systems in chimpanzees." J Infect Dis **179**(3): 646-652.
- Lee, K., et al. "Spontaneous and aging-dependent development of arthritis in NADPH oxidase 2 deficiency through altered differentiation of CD11b+ and Th/Treg cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(23): 9548-9553.
- Lefer, A. M. (1970). "Role of a myocardial depressant factor in the pathogenesis of circulatory shock." Fed Proc **29**(6): 1836-1847.
- Levy, M. M., et al. (2003). "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." Crit Care Med **31**(4): 1250-1256.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Maltsev, V. A., et al. (1994). "Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents." Circulation Research **75**(2): 233-244.
- Metzger, J. M., et al. (1996). "Vital staining of cardiac myocytes during embryonic stem cell cardiogenesis in vitro." Circulation Research **78**(4): 547-552.
- Moore, K. J., et al. (1998). "In vitro-differentiated embryonic stem cell macrophages: a model system for studying atherosclerosis-associated macrophage functions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(10): 1647-1654.
- Morrison, D. C. and J. L. Ryan (1987). "Endotoxins and disease mechanisms." Annu Rev Med **38**: 417-432.
- Mudd, E. B. and S. Mudd (1933). "The Process of Phagocytosis : the Agreement between Direct Observation and Deductions from Theory." J Gen Physiol **16**(4): 625-636.
- Mullis, K., et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.
- Munoz, C., et al. (1991). "Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis." J Clin Invest **88**(5): 1747-1754.
- Nathan, C. F., et al. (1983). "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." J Exp Med **158**(3): 670-689.
- Nathan, C. F., et al. (1984). "Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma." J Exp Med **160**(2): 600-605.

- Newburger, P. E., et al. (1988). "Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5215-5219.
- Nichols, J., et al. (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-391.
- Nijsten, M. W., et al. (2000). "Procalcitonin behaves as a fast responding acute phase protein in vivo and in vitro." Crit Care Med **28**(2): 458-461.
- Oberhoffer, M., et al. (1999). "Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro." J Lab Clin Med **134**(1): 49-55.
- Okabe, E., et al. (1985). "Inhibition by free radical scavengers and by cyclooxygenase inhibitors of the effect of acidosis on calcium transport by masseter muscle sarcoplasmic reticulum." Biochem Pharmacol **34**(7): 961-968.
- Oudot, A., et al. (2003). "Angiotensin II activates NADPH oxidase in isolated rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion." Eur J Pharmacol **462**(1-3): 145-154.
- Paoli, G., et al. "[Myocardial dysfunction during sepsis: epidemiology, prognosis and treatment]." G Ital Cardiol (Rome) **12**(12): 804-814.
- Parrillo, J. E., et al. (1990). "Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy." Ann Intern Med **113**(3): 227-242.
- Rietschel, E. T., et al. (1994). "Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function." Faseb J **8**(2): 217-225.
- Robbins, J., et al. (1990). "Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro." J Biol Chem **265**(20): 11905-11909.
- Rohwedel, J., et al. (1994). "Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents." Dev Biol **164**(1): 87-101.
- Root, R. K. and J. A. Metcalf (1977). "H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. Relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H₂O₂: studies with normal and cytochalasin B-treated cells." J Clin Invest **60**(6): 1266-1279.
- Rossi, F. and M. Zatti (1964). "Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells." Experientia **20**(1): 21-23.
- Russwurm, S., et al. (1999). "Procalcitonin--a novel biochemical marker for the mediator-directed therapy of sepsis." Mol Med Today **5**(7): 286-287.
- Sagy, M., et al. (2013) "Definitions and pathophysiology of sepsis." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care **43**(10): 260-263.

- Salvemini, D. and S. Cuzzocrea (2002). "Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation." Free Radic Biol Med **33**(9): 1173-1185.
- Schindler, R., et al. (1990). "Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF." Blood **75**(1): 40-47.
- Schlattmann, P. and F. M. Brunkhorst "Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis." Lancet Infect Dis **14**(3): 189.
- Schreck, R., et al. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." Embo J **10**(8): 2247-2258.
- Schumann, R. R., et al. (1994). "The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin." Med Microbiol Immunol **183**(6): 279-297.
- Selby, P., et al. (1987). "Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations." Br J Cancer **56**(6): 803-808.
- Serrano, F., et al. (2003). "NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain." Brain Res **988**(1-2): 193-198.
- Shalaby, M. R., et al. (1989). "Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo." Clin Immunol Immunopathol **53**(3): 488-498.
- Sies, H. and R. Mehlhorn (1986). "Mutagenicity of nitroxide-free radicals." Arch Biochem Biophys **251**(1): 393-396.
- Simon, L., et al. (2004). "Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis." Clin Infect Dis **39**(2): 206-217.
- Smith, A. G., et al. (1988). "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." Nature **336**(6200): 688-690.
- Strubing, C., et al. (1995). "Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons." Mech Dev **53**(2): 275-287.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.
- Tejada-Simon, M. V., et al. (2005). "Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus." Mol Cell Neurosci **29**(1): 97-106.
- Tomioka, I., et al. "Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28." Genes Cells **15**(9): 959-969.

- van der Poll, T., et al. (1995). "Interleukin-1 contributes to increased concentrations of soluble tumor necrosis factor receptor type I in sepsis." J Infect Dis **172**(2): 577-580.
- Vittet, D., et al. (1996). "Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps." Blood **88**(9): 3424-3431.
- Wartenberg, M., et al. (1998). "The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents." Lab Invest **78**(10): 1301-1314.
- Westfall, M. V., et al. (1996). "Troponin I isoform expression is developmentally regulated in differentiating embryonic stem cell-derived cardiac myocytes." Dev Dyn **206**(1): 24-38.
- Wiles, M. V. and G. Keller (1991). "Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture." Development **111**(2): 259-267.
- Winkelstein, J. A., et al. (2000). "Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients." Medicine (Baltimore) **79**(3): 155-169.
- Wobus, A. M., et al. (1997). "Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol **29**(6): 1525-1539.
- Wobus, A. M., et al. (1991). "Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers." Differentiation **48**(3): 173-182.
- Yamanaka, S. and K. Takahashi (2006). "[Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **51**(15): 2346-2351.

9 Anhang

9.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Maria Wartenberg [Friedrich- Schiller-Universität], Dr. med. Andreas Finkensieper [Friedrich- Schiller-Universität].

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Saskia Nitza

9.2 Danksagung

Mein Dank gilt der Arbeitsgruppe Stammzellforschung und Prof. Maria Wartenberg für die Bereitstellung des Themas.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Wartenberg für die stete Unterstützung bedanken, die mich in meiner wissenschaftlichen Arbeit geprägt hat.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Andreas Finkensieper für die zahlreichen Anregungen, seine Unterstützung und vor allem die konstruktive Kritik bedanken, die einen entscheidenden Teil zum Fortschreiten der Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern und Doktoranden und Studenten der AG Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung für ihre Mitarbeit bei der planerischen und technischen Durchführung der Versuche. Besonderer Dank gilt hier Frau Voigt, die mir in jeder Situation mit Rat und Tat zur Seite stand.

Gleichmaßen möchte ich meiner Familie, meinen Freunden, meiner Mutter und meinem Vater für die fürsorgliche und liebevolle Unterstützung und Motivation danken, die vorliegende wissenschaftliche Arbeit erfolgreich zu beenden.

9.3 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name:	Saskia Nitza
Geburtsdatum:	25.07.1983
Geburtsort:	Berlin

Schulausbildung

1991-1996	Rehberge-Grundschule, Berlin
1997-2003	Lessing-Gymnasium, Berlin
06/2003	Abitur

Berufsausbildung

2004-2007	Ausbildung zur MTLA Lette-Verein, Berlin
01/2007	Abschluss der MTLA- Ausbildung

Berufliche Tätigkeiten

2007-2008	Histologischen Labor von Dr. Thomas Gaul und Andreas Switala An der Schlossparkklinik Heubnerweg 2a 14059 Berlin
-----------	--

Seit 2012	Dozentin am Lette-Verein, Berlin
-----------	----------------------------------

Studium

10/2008	Medizinstudium an der FSU Jena
08/2011	Physikum
10/2014	Schriftliches Examen, M2

Praktisches Jahr

11/2014-03/2015	Wahlfach Radiologie, FSU Jena
03-06/2015	Innere Medizin, FSU Jena
06-10/2015	Chirurgie, FSU Jena

9.4 Publikation

Finkensieper A, Bekhite M, Fischer H, Nitza S, Figulla HR, Müller JP, Sauer H, Wartenberg M. Antibacterial capacity of differentiated murine embryonic stem cells during defined in vitro inflammatory conditions. Stem Cells and Development 2012; (doi:10.1089/scd.2012.0528)